WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN 2-µm DNA UND ABGELEITETEN PLASMIDEN IN DER BÄCKERHEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

ELKE ERHART
aus Hamburg

Düsseldorf 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0040

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN 2-μm DNA UND ABGELEITETEN PLASMIDEN IN DER BÄCKERHEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

ELKE ERHART
aus Hamburg

Düsseldorf 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Stämme und Medien	8
2.1.1.	Hefestämme	8
2.1.2.	Medien für die Hefestämme	8
2.1.3.	Bakterienstämme	9
2.1.4.	Medien für die Bakterienstämme	9
2.2.	Rekombinantplasmide	9
2.3.	DNA-Präparationen	10
2.3.1.	DNA-Isolierung aus Hefe	10
2.3.1.1.	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung	10
2.3.1.2.	Mini-DNA-Präparation	10
2.3.2.	Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli	11
2.3.2.1.	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung	11
2.3.2.2.	Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli Minilysaten	11
2.4.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen	12
2.5.	Gelelektrophorese	12
2.6.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	12
2.7.	Reinigung verdauter DNA vor der Ligation	13
2.8.	DNA-Ligation	13
2.9.	Konstruktion von Plasmiden	13
2.10.	E. coli Transformation	15
2.11.	Hefetransformation	15
2.11.1.	Nichtselektive Hefetransformation	16
2.12.	Nick-Translation	16
2.13.	Southern-Transfer	17
2.14.	DNA-DNA-Hybridisierung	17
2.15.	Autoradiographie	18
2.16.	Hefe-Koloniehybridisierung	18
2.17.	Qualitativer Nachweis der ß-Lactamase-Aktivität in Hefetransformanten	18
2.18.	Bestimmung der ß-Isopropylmalat-dehydrogenase-Aktivität in Hefe	19
2.19.	DNA-Sequenzierung	20

		Seite
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Stabilität von Rekombinantplasmiden in Hefe	23
3.1.1.	Hefetransformation	24
3.1.2.	Nachweis der Plasmide in Hefe	24
3.1.3.	Stabilität von Rekombinantplasmiden in CIR^+ Stämmen	25
3.1.3.1.	Einfluß der 2-µm DNA-Sequenzen	27
3.1.3.2.	Einfluß des bakteriellen Vektors	28
3.1.3.3.	Einfluß des selektiven Markers	29
3.1.3.4.	Besondere Eigenschaften von Transformanten mit leu2-d Plasmiden	30
3.1.4.	Stabilität von Rekombinantplasmiden im cir^o Stamm YT6-2-1L	32
3.1.5.	Rekombination zwischen endogener 2-µm DNA und pMP78	34
3.2.	Verlust endogener 2-µm DNA	38
3.2.1.	2-µm DNA-Gehalt in AH22 und YNN27	38
3.2.2.	Spontaner Verlust der 2-µm DNA	41
3.2.3.	Verlust endogener 2-µm DNA nach Transformation	41
3.2.3.1.	2-µm DNA-Verlust nach Transformation mit leu2-d Plasmiden	42
3.2.3.2.	2-µm DNA nichtkurierende Plasmide	45
3.2.3.3.	Einfluß der Plasmidkopienzahlen auf den 2-µm DNA-Verlust	47
3.2.3.4.	Einfluß der Transformationsbedingungen auf den 2-µm DNA-Verlust	52
3.2.3.5.	Rekombinantplasmide mit dem leu2-d Allel, die keinen 2-µm DNA-Verlust bewirken	57
3.3.	Vergleich zwischen dem leu2-d Allel und dem LEU2 Wildtypallel	61
3.3.1.	Regulation der ß-Isopropylmalatdehydrogenase	61
3.3.2.	LEU2 Wildtypallel und leu2-d Allel auf dem Plasmid YRp7	65
3.3.3.	Vergleich des leu2-d DNA-Fragmentes mit den LEU2 Wildtypallel DNA-Fragmenten	67

		Seite
4.	Diskussion	71
4.1.	Stabilität der Rekombinantplasmide	71
4.2.	2-µm DNA-Verlust nach Transformation	76
4.3.	Eigenschaften der leu2-d Plasmide	77
4.4.	LEU2 Expression und Regulation	80
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	87
7.	Abkürzungen	94

1. Einleitung

Die meisten Stämme von Saccharomyces cerevisiae enthalten 2-µm DNA, ein zirkuläres, doppelsträngiges Plasmid, das in 50-100 Kopien pro haploider Zelle vorliegt und etwa 2 % der Gesamt-DNA ausmacht (Sinclair et al. 1967, Hollenberg et al. 1970, Clark-Walker und Miklos 1974). Da die 2-µm DNA nicht nach den Regeln von Mendel vererbt wird (Livingston 1977), wurde sie als cytoplasmatisches DNA-Element angesehen. Später ergaben sich jedoch viele Hinweise dafür, daß die 2-µm DNA im Zellkern lokalisiert ist. Unter normalen Wachstumsbedingungen steht die Replikation der 2-µm DNA unter Kontrolle des Zellzyklus. Jedes Plasmid-Molekül wird wie die Kern-DNA einmal in der frühen S-Phase repliziert (Zakian et al. 1979). Die Replikation der 2-µm DNA wird außerdem zumindest teilweise durch die gleichen Gene wie die chromosomale DNA reguliert (Petes und Williamson 1975, Livingston und Kupfer 1977). Weiterhin weist das 2-µm DNA-Plasmid die typische Nucleosomenstruktur auf (Nelson und Fangman 1979, Livingston und Hahne 1979, Seligy et al. 1980). Der (dA+dT)-Gehalt der 2-µm DNA beträgt 61 % und entspricht damit etwa dem der Kern-DNA von 60,3 % (Bernardi et al. 1970). 2-µm DNA enthält keine der Kern-DNA homologen Sequenzen und kommt auch nicht in das Chromosom integriert vor (Cameron et al. 1977, Tabak 1977).

Das 2-µm DNA-Plasmid wurde von Hartley und Donelson (1980) vollständig sequenziert. Das Molekül besteht aus 6318 bp. Charakteristisch sind zwei Regionen von jeweils 599 bp, IR1 und IR2 genannt (Abb. 1), deren Basensequenzen identisch, aber gegenläufig zueinander angeordnet sind (inverted repeats). Durch die IR-Bereiche wird das Plasmidmolekül in zwei etwa gleich große Regionen von 2,7 und 2,3 kb geteilt. Über die inversen Duplikationen kommt es vermutlich zur intramolekularen Rekombination, so daß in der Hefezelle zwei verschiedene Formen der 2-µm DNA vorliegen, die sich hinsichtlich der Orientierung der einen Molekülhälfte zur anderen unterscheiden (Abb. 1). Beide

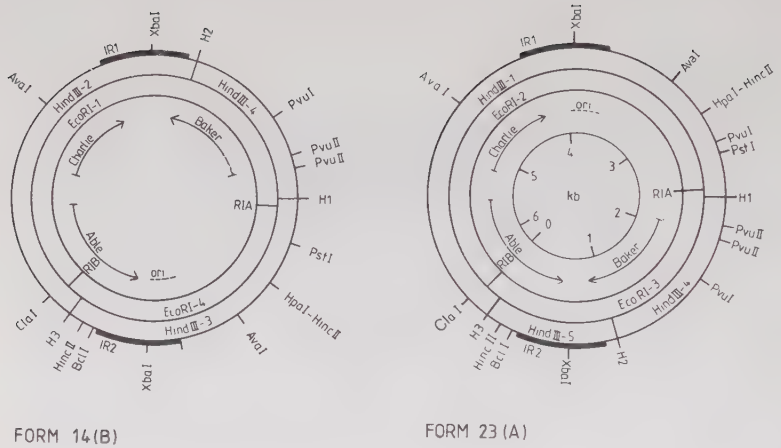


Abb. 1 Restriktionskarten der beiden Formen der 2-µm DNA nach Hollenberg (1982). RIA, RIB sind die EcoRI-Schnittstellen; H1, H2 ,H3 die HindIII-Schnittstellen.

Formen der 2-µm DNA, Typ 14 oder B und Typ 23 oder A, liegen in der Zelle in äquivalenten Mengen vor.
Die 2-µm DNA-Sequenz enthält drei große offene Leseraster A(ble), B(aker) und C(harlie) (Abb. 1), die als Protein codierende Regionen fungieren könnten. Diese DNA-Bereiche A, B und C entsprechen hinsichtlich ihrer Lage und Orientierung den Teilen der 2-µm DNA, die in Hefe in polyadenylierte RNA transkribiert werden (Broach et al. 1979, Preibisch in Vorbereitung) und die Polypeptide codieren könnten, die von Hollenberg et al. (1976) und Hollenberg (1978) in E. coli Minizellen nachgewiesen wurden.
Der Startpunkt für die 2-µm DNA-Replikation ("ori" in Abb. 1) liegt in einer 350 bp großen Region, die von der Mitte des IR1 in Typ 23 bzw. des IR2 in Typ 14 des Moleküls etwa 100 bp in die rechte Molekülhälfte hineinläuft (Broach und Hicks 1980). Für effiziente Replikation und den Erhalt der 2-µm DNA in hoher Kopienzahl sollen die Genprodukte

der Leseraster B und C, auch REP1 und REP2 genannt, erforderlich sein (Broach und Hicks 1980, Broach et al. 1981).

Für die Interkonversion zwischen den beiden Formen der 2-µm DNA scheint das Genprodukt des Leserasters A, des FLP Gens, erforderlich zu sein (Broach und Hicks 1980). Die durch das FLP Genprodukt vermittelte Rekombination läuft über eine bestimmte etwa 60 bp umfassende DNA-Sequenz mitten auf den IR-Sequenzen der 2-µm DNA ab (Broach et al. 1982). Die Funktion der Interkonversion der 2-µm DNA ist unbekannt. Im Gegensatz zum Replikationsstartpunkt der 2-µm DNA sind die REP Gene und das FLP Gen offensichtlich auch in trans aktiv. So sind Rekombinantplasmide, die weder REP1 noch REP2 auf ihrem 2-µm DNA-Fragment enthalten, in hoher Kopienzahl vorhanden, wenn außerdem in der Zelle endogene 2-µm DNA-Moleküle vorliegen. Ebenso kommt es zur Interkonversion von Rekombinantplasmiden ohne intaktem FLP Gen, wenn zusätzlich vollständige 2-µm DNA-Moleküle anwesend sind (Broach und Hicks 1980).

Die 2-µm DNA scheint nur Gene zu tragen, die für ihre eigene Replikation, den Erhalt in hoher Kopienzahl und die Weitergabe auf Tochterzellen notwendig sind. Physiologische Funktionen der 2-µm DNA für die Hefezelle sind bisher unbekannt. Zellen, die endogene 2-µm DNA verloren haben, können in ihren Eigenschaften nicht von dem 2-µm DNA enthaltenden Ausgangsstamm unterschieden werden. Holm (1982a, 1982b) entdeckte, daß Saccharomyces carlsbergensis Stämme, die die chromosomale nib1 Mutation tragen, nur dann morphologisch veränderte Kolonien mit rauher Oberfläche und gekerbtem Rand bilden, wenn sie 2-µm DNA-Moleküle enthalten. Diese Kolonien enthalten neben normalen Zellen außergewöhnlich große Hefezellen vermutlich als Folge von Defekten bei der DNA-Replikation oder Zellteilung. Solche großen Zellen sind nicht lebensfähig und sterben nach einigen Generationen ab. Dadurch kommt es zur Entstehung lethaler Sektoren in den Kolonien. Die Zunahme der Zellgröße soll durch die Erhö-

hung der 2-µm DNA-Kopienzahl verursacht werden. Holm (1982a) nimmt an, daß das NIB1 Genprodukt die Amplifikation der 2-µm DNA-Moleküle kontrolliert, und daß das nib1 Allel in dieser Funktion defekt ist.
Eine wichtige Rolle spielt die 2-µm DNA als effizienter Vektor zur Transformation von Hefe. Beggs (1978), Struhl et al. (1979) und Hicks et al. (1979) konstruierten Rekombinantplasmide aus 2-µm DNA, E. coli Plasmiden und einem komplementierenden Hefegen wie LEU2, HIS3 oder URA3. Mit solchen Plasmiden erzielt man hohe Transformationsfrequenzen von 10^4 - 10^5 Transformanten pro µg DNA. Wie die endogene 2-µm DNA liegen Rekombinantplasmide mit dem Replikationsstartbereich der 2-µm DNA extrachromosomal in mehreren Kopien pro Zelle vor.
Etwa um eine Zehnerpotenz niedriger liegende Transformationsfrequenzen erzielt man mit Plasmiden, die anstelle des 2-µm DNA-Replikons chromosomale Replikationsstartpunkte enthalten. Solche sogenannten ARS Sequenzen (= autonomous replicating sequences, Stinchcomb et al. 1979) liegen zum Beispiel benachbart zum TRP1 Gen (Struhl et al. 1979, Kingsman et al. 1979) und zum ARG4 Gen (Hsiao und Carbon 1979). Außerdem gibt es Plasmide mit mitochondrialen, als ARS fungierenden DNA-Sequenzen (Hyman et al. 1982). ARS tragende Plasmide sind instabiler als 2-µm DNA-Vektoren und kommen in niedrigeren Kopienzahlen pro Zelle vor. Die Stabilität der ARS Plasmide kann durch Integration chromosomaler DNA-Fragmente mit Centromerregionen verbessert werden (Clarke und Carbon 1980, Hsiao und Carbon 1981, Stinchcomb et al. 1982). Solche CEN Plasmide verhalten sich wie "Minichromosomen" und kommen meist auch in nur einer Kopie pro haploidem Genom vor. Abgeleitet von ARS Plasmiden sind lineare Vektoren, die terminale Fragmente von Tetrahymena rDNA tragen, die als Telomere in Hefe funktionieren (Szostak und Blackburn 1982).
Den in Hefe autonom replizierenden Rekombinantplasmiden stehen die Integrationsvektoren gegenüber, die durch Rekombination über homologe DNA-Sequenzen ins Hefegenom ein-

gebaut werden (Hinnen et al. 1978, Hicks et al. 1979). Diese Transformanten sind sehr stabil, die transformierten Gene liegen meist in nur einer Kopie vor. Die Transformationsrate für Integrationsvektoren ist sehr niedrig und liegt bei 1-10 Transformanten pro µg DNA.
Von allen bisher zur Hefetransformation verwendeten Vektoren weisen Rekombinantplasmide mit dem 2-µm DNA-Replikon die höchsten Transformationsraten auf. Sie werden in hoher Kopienzahl autonom repliziert und sind stabiler als ARS Plasmide. Aus diesen Gründen sind 2-µm DNA tragende Rekombinantplasmide zur Untersuchung der Expression fremder Gene in Hefe gut geeignet. Mit Hilfe solcher Plasmide konnte die Expression verschiedener pro- und eukaryontischer Gene in Saccharomyces cerevisiae nachgewiesen werden (Hollenberg 1979, Beggs et al. 1980, Cohen et al. 1980, Mercereau-Puijalon et al. 1980, Panthier et al. 1980, Hitzeman et al. 1981, Roggenkamp et al. 1981, Janowicz et al. 1983).
In dieser Arbeit wird untersucht, von welchen Faktoren die Stabilität von Rekombinantplasmiden mit dem 2-µm DNA-Replikon in Hefe beeinflußt wird, und welchen Effekt solche Rekombinantplasmide auf die natürliche 2-µm DNA ausüben.
Die Stabilität von 2-µm DNA-Vektoren in Hefe kann unter mehreren Aspekten betrachtet werden:
(1) Die verschiedenen funktionellen DNA-Bereiche der Rekombinantplasmide (2-µm DNA-Fragment, bakterielle DNA und selektiver Marker) könnten einen Einfluß auf die Stabilität der Plasmide haben. Nach Untersuchungen von Broach und Hicks (1980) und Broach et al. (1981) an Saccharomyces carlsbergensis Stämmen ist zur autonomen Replikation der 2-µm DNA-Rekombinantplasmide die Replikationsstartstelle der 2-µm DNA unbedingt auf den Plasmiden erforderlich. Weiterhin waren Plasmide, die die REP Gene der 2-µm DNA trugen, stabiler als solche, die diese nicht enthielten. Die REP Gene sollen für stabile Replikation und den Erhalt der Plasmide in hoher Kopienzahl notwendig sein.

Untersuchungen über den Einfluß der bakteriellen DNA und des selektiven Markers auf dem Rekombinantplasmid gibt es bisher nicht.

(2) Natürliche und rekombinante 2-µm DNA-Moleküle benutzen das gleiche Replikationssystem. Es erhebt sich die Frage, ob die Stabilität bzw. Instabilität der Rekombinantplasmide durch Inkompatibilität zwischen endogener 2-µm DNA und Rekombinantplasmiden in Analogie zu bakteriellen Systemen hervorgerufen wird.

(3) Auch die Kopienzahl der Rekombinantplasmide könnte die Stabilität beeinflussen. Möglicherweise segregieren Plasmide, die in höherer Anzahl pro Zelle vorliegen, langsamer aus als solche, die in nur wenigen Kopien vorkommen. Die Kopienzahl an endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen gibt auch Hinweise auf die Inkompatibilität zwischen den Plasmiden.

(4) Es kann zur Rekombination zwischen Rekombinantplasmiden und endogener 2-µm DNA über homologe 2-µm DNA-Sequenzen kommen. Dadurch können Moleküle mit veränderter Struktur entstehen, was sich möglicherweise auf die Stabilität auswirkt. So beschrieben Dobson et al. (1980b), daß nach Rekombination zwischen dem Plasmid pJDB219 und 2-µm DNA ein Molekül entstanden war, das nur noch 2-µm DNA und den selektiven Marker enthielt und stabiler war als das Ausgangsplasmid.

In dieser Arbeit wird die Stabilität von Rekombinantplasmiden mit verschiedenen 2-µm DNA-Fragmenten, selektiven Markern und bakteriellen Vektoren verglichen. Der Einfluß endogener 2-µm DNA wird analysiert durch Bestimmung der Stabilität von Rekombinantplasmiden in CIR^+ Stämmen und einem isogenen cir^o Stamm. Außerdem wird die Plasmidzusammensetzung in verschiedenen Hefetransformanten ermittelt.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit behandelt wird, ist, ob die Stabilität endogener 2-µm DNA durch das Vorhandensein von Rekombinantplasmiden in Transformanten verändert wird. Die natürliche 2-µm DNA in Hefe ist sehr

stabil, und es ist bisher nicht gelungen, die Replikation oder Transmission der 2-µm DNA spezifisch zu hemmen. Es ist nicht möglich, 2-µm DNA wie mitochondriale Hefe-DNA oder bakterielle Plasmide durch Behandlung mit Ethidiumbromid oder Acridinorange aus der Zelle zu entfernen.
Für viele Zwecke wäre es aber nützlich, cir^{o} Stämme ohne endogene 2-µm DNA zu haben. So könnte man in cir^{o} Stämmen die Eigenschaften einzelner 2-µm DNA-Fragmente untersuchen. Außerdem sind cir^{o} Stämme gute Wirte für rekombinante 2-µm DNA-Moleküle, da es nicht zur Rekombination mit endogener 2-µm DNA und dadurch bedingte Veränderungen der Plasmidstruktur kommen kann. Nach Untersuchungen von Blanc et al. (1979) waren einige Rekombinantplasmide im cir^{o} Stamm stabiler als im CIR^{+} Stamm.
Bei der Untersuchung der Expression von Antibiotika-Resistenzgenen in Hefe entdeckte Hollenberg (1979), daß die Hefezellen nach Verlust des Rekombinantplasmides oft auch keine 2-µm DNA mehr enthielten. Diesem Phänomen wird in dieser Arbeit nachgegangen. Es wird untersucht, in welchen Transformanten es zum Verlust der 2-µm DNA kommt, ob die Struktur und Funktion der Rekombinantplasmide oder die Transformations- und Wachstumsbedingungen einen Einfluß darauf haben.

2. Material und Methoden

2.1. Stämme und Medien

2.1.1. Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae H1, eine Adenin-bedürftige Mutante des Stammes Hansen, CBS 4593.
S. cerevisiae AH22 (leu2-3, leu2-112, his4-519, can1) konstruiert von Hinnen et al. (1978).
S. cerevisiae GRF18 (=LL20) (leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15), isogen mit AH22, konstruiert von G.R. Fink.
S. cerevisiae YNN27 (ura3-52, trp1-289, gal2) von Stinchcomb et al. (1980).
S. cerevisiae YT6-2-1L (cir^{o}, leu2-3, leu2-112, his4-519, can1) ist abgeleitet von AH22 und wurde von C. P. Hollenberg in unserem Labor isoliert.
S. cerevisiae AY2a (leu2-3, leu2-112, his4-519, trp1-289) wurde für diese Arbeit konstruiert und erhalten durch Kreuzung von AH22 mit YNN27.
Die Hefestämme wurden bei 30 °C angezogen.

1.1.2. Medien für die Hefestämme

Vollmedium (YEPD-Medium):	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose
Minimalmedium (YNB-Medium):	0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, 2 % Glucose, 3,13 ml 50 %ige Na-Lactatlösung ad 1 l H_2O. Notwendige Aminosäuren und Basen wurden in der Endkonzentration von 20 µg/ml zugefügt, wenn nicht anders angegeben.

Für Nährböden wurden den Medien 2 % Agar zugegeben.

2.1.3. Bakterienstämme

Escherichia coli JA221 recA1, leuB6, trpE5, $hsdR^-$, $hsdM^+$, lacY, C600 konstruiert von J. Carbon.
E. coli JA300 thr^-, leuB6, thi^-, thyA, trpC1117, hsr_k, hsm_k, str^r von Tschumper und Carbon (1980).
Die Anzucht der E. coli Stämme erfolgte bei 37 °C.

2.1.4. Medien für die Bakterienstämme

Vollmedium (L-Broth): 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose.

Minimalmedium (M9-Medium): Es wurden verschiedene Stammlösungen hergestellt, die getrennt sterilisiert und dann zusammengegeben wurden.
100 ml 4 %ige Glucoselösung, 10 ml $MgSO_4$-Lösung (2,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$/ 100 ml Aq. dest.), 10 ml $CaCl_2$-Lösung (0,2 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$/ 100 ml Aq. dest.), 100 ml M9-Salzlösung (10 g Na_2HPO_4, 30 g KH_2PO_4, 5 g NaCl, 10 g NH_4Cl, 1 l Aq. dest.), 750 ml Aq. dest.

Zugabe von Aminosäuren in der Endkonzentration von 20 µg/ml, von Thymin 50 µg/ml und von Thiamin 2 µg/ml.
Antibiotika-Endkonzentrationen waren: Penicillin G (150 µg/ml), Tetrazyklin (10 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Kanamycin (20 µg/ml).
Für Nährböden wurde zu den Medien 2 % Agar gegeben.

2.2. Rekombinantplasmide

pBR322 (Bolivar et al. 1977), pBR325 (Bolivar 1978), pYe10 (Hinnen et al. 1978), pKB4101 und pKB4102 wurden von K. Breunig in unserem Labor konstruiert, YRp7 und YEp6 (Struhl et al. 1979), BTYP-2 (Hollenberg 1978), pJDB219 (Beggs 1978), pMP78, pMP80 und pMP81 (Hollenberg 1979), pDB248 (Beach und Nurse 1981), pMA56 (Hitzeman et al. 1981), pADH040-2 und pARS040-2 (Reipen 1982).

Für diese Arbeit wurden folgende Plasmide konstruiert (siehe 2.9): pHKB52, pL610, pL616, pL623, pL72, YRp7-leu2-d, YRp7-LEU2.

2.3. DNA-Präparationen

2.3.1. DNA-Isolierung aus Hefe

2.3.1.1. Präparative Plasmid-DNA-Isolierung

Die Isolierung erfolgte nach der Methode von Guerineau et al. (1971) mit einigen Abänderungen.
1 g Zellen, die 1 x mit Aq. dest und 1 x mit Guerineau-Puffer (0,6 M Sorbit, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen wurden, wurden in 1 ml dieses Puffers aufgenommen und nach Zugabe von 4 g Glasperlen (0,45 mm Ø) 1 min auf Stufe 1 im Braun-Homogenisator zerschlagen. Anschließend wurden die Glasperlen durch Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min abgetrennt. Das Homogenisat wurde dann 15 min bei 25000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml 1xSSC aufgenommen. Lysis der Membranen erfolgte durch Zugabe von 10 % SDS bis zur Endkonzentration von 0,5 % und Inkubation bei 65 °C für 20 min. Nach Abkühlen der Probe wurde 5 M Kaliumacetat bis zur Endkonzentration von 1 M zugegeben. Proteine und SDS fielen im Eis aus (1 h). Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation 10 min bei 30000 x g abgetrennt. Zum Überstand wurden 1 g CsCl pro ml und 0,75 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Diese Lösung wurde im Beckman 50Ti-Rotor 40 h bei 44000 rpm zentrifugiert.
Danach wurde die Plasmidbande mit einer Spritze aus dem Gradientenröhrchen geholt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit je 1 Volumen Isoamylalkohol entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 2 Volumen 96 % Ethanol gefällt und das Pellet in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen. Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.1.2. Mini-DNA-Präparation (Struhl et al. 1979)

1 - 10 ml einer Minimal- oder 5 ml einer Vollmediumkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden einmal mit Aq. dest. und einmal mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in Sphäroplastenpuffer (1,2 M Sorbit, 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 14 mM ß-Mercaptoethanol) plus 50 µl Zymolyaselösung (10 mg/ml Zymolyase 5000 (Kirin Brewery) in 50 % Glycerin) resuspendiert und 30 - 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Protoplasten wurden abzentrifugiert, in 500 µl 50 mM EDTA (pH 8,5)

aufgenommen und nach Zugabe von 20 µl 10 %iger SDS-Lösung lysiert bei 65 °C für 20 min. Das Lysat wurde in Eis abgekühlt, dann wurden 100 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben.
Nach 1 h in Eis wurde das Präzipitat bei 22 000 x g für 10 min abzentrifugiert. Die DNA befand sich im Überstand und wurde mit 300 µl 96 %igem Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 50 - 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst. 2 - 5 µl dieser Lösung wurden für einen Verdauungsansatz mit anschließender Southern-Hybridisierung eingesetzt.

2.3.2. Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli (Clewell und Helinski 1969)

2.3.2.1. Präparative Plasmid-Isolierung

Eine 300 ml E. coli Übernachtkultur wurde einmal mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)/25 %iger Saccharoselösung gewaschen und in 50 ml dieser Lösung aufgenommen. 10 ml Lysozymlösung (5 mg/ml in Tris/Saccharose) und 2,5 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) wurden zur Protoplastenbildung zugefügt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert durch Zugabe von 25 ml 3 x konz. Triton-Mix (3 ml 10 % Triton X-100, 75 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0), 15 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 7 ml H_2O). Durch Zentrifugation bei 25 000 x g für 30 min wurden Zellreste und der größte Teil der chromosomalen DNA abgetrennt. Der Überstand wurde mit 50 ml Aq. dest. verdünnt. Nach anschließender Phenolextraktion und Fällung der DNA mit 2 Volumen 96 % Ethanol wurde das DNA-Pellet in 14 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst. Es wurden 1,4 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) und 1 g CsCl/ml zugefügt. Gleichgewichtszentrifugation erfolgt im Beckman Vertikalrotor VTi50 bei 44 000 rpm für 18 h. Die Plasmidbande wurde mit einer Spritze aus dem Gradientenröhrchen geholt. Das Ethidiumbromid wurde dann durch mehrmaliges Ausschütteln mit je 1 Volumen Isoamylalkohol entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 2 Volumen 96 % Ethanol gefällt und das getrocknete Pellet in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen. Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2.2. Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli Minilysaten

Diese Methode ist von der unter 2.3.2.1. beschriebenen Plasmid-DNA-Isolierung abgeleitet. Im Unterschied zu 2.3.2.1. wurden geringere

Volumina eingesetzt, und die DNA wurde nicht über einen CsCl-Gradienten gereinigt; die Lösungen sind die gleichen.
5 - 10 ml einer E. coli Übernachtkultur wurden abzentrifugiert, die Zellen einmal mit Tris/Saccharose-Lösung gewaschen und in 1 ml Tris/Saccharose-Lösung aufgenommen. Es wurden 0,2 ml Lysozymlösung, 50 µl 0,5 M EDTA zugegeben und nach 10 min Inkubation 0,5 ml Triton-Mix hinzugefügt. Das Lysat wurde 40 min bei 27 000 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1 ml Aq. dest. verdünnt. Nach Phenolextraktion und anschließender Ethanolfällung wurde das Pellet getrocknet und dann in 50 - 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst. Für einen Verdauungsansatz wurden 5 - 10 µl dieser DNA-Lösung eingesetzt.

2.4. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

Die DNA-Verdauungen wurden nach den für das jeweilige Enzym vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Abweichend davon war das Reaktionsvolumen für die Verdauung von 1 µg DNA 20 µl, und die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C.

2.5. Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden auf 0,7 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Es wurden jeweils 0,5 - 1,0 µg DNA plus 2,5 µl Bromphenolblaulösung (0,2 %ig in 60 % Sucrose in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)), die zur Markierung der Lauffront diente, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 4 - 5 h bei 80 V oder über Nacht bei 35 V bei Raumtemperatur durchgeführt.
Als Laufpuffer wurde Tris-Acetat-Puffer nach Saunders et al. (1975) verwendet, der wie folgt zusammengesetzt ist: 4,8 Tris-HCl, 2,29 ml Eisessig, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,5), 0,5 mg Ethidiumbromid pro 1 l Aq. dest. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,7 eingestellt.

2.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach der "Freeze-Squeeze-Methode" von Thuring et al. (1975) isoliert. Die mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, zwischen die Hälften eines

gefalteten Parafilm-Bogens gelegt und in Trockeneis bei -70 °C schnell eingefroren. Nach 3 - 5 min in Trockeneis wurde das gefrorene Gelbröckchen mit dem Daumen vorsichtig zerquetscht. Der Elektrophoresepuffer mit der darin gelösten DNA tritt aus dem Gel aus und bildet Tropfen auf dem Parafilm, die Agarose bleibt am Parafilm kleben. Die ausgequetschte Lösung wurde 5 min in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, um noch vorhandene Agarosereste zu entfernen. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/50 Volumen 5 M Kaliumacetat und 2 Volumen 96 % Ethanol gefällt. Die so isolierten DNA-Fragmente konnten ohne weitere Reinigung für die Nick-Translation verwendet werden.

2.7. Reinigung verdauter DNA vor der Ligation

Der Verdauungsansatz von 20 µl wurde mit Aq. dest. auf 50 µl aufgefüllt. Proteine wurden entfernt durch einmalige Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Die wässrige Phase wurde dann mit 5 µl 500 mM NaCl versetzt und die DNA mit 2 Volumen 96 % Ethanol 30 min bei -20 °C oder 10 min bei -70 °C gefällt. Das Pellet wurde in 5 - 10 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen.

2.8. DNA-Ligation

1 µg DNA wurde in 20 µl Gesamtvolumen mit 0,1 Enzymeinheiten T_4-Ligase (Boehringer, Mannheim) über Nacht bei 15 °C ligiert. Der Ligationspuffer enthielt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM ATP.
5 µl des Ligationsansatzes wurden ohne weitere Aufreinigung direkt für die E. coli Transformation eingesetzt.

2.9. Konstruktion von Plasmiden

pHKB52 (Abb.3)
Ausgangsplasmide waren BTYP-2 und pKB4102. BTYP-2 enthält die gesamte 2-µm DNA integriert in die PstI-Schnittstelle von pBR322. pKB4102 besteht aus pBR322, in dessen SalI-Schnittstelle das SalI/XhoI-Fragment mit dem LEU2-Gen aus pYe10 kloniert wurde. Zur Konstruktion von pHKB52

wurde pKB4102 mit PstI verdaut, und in die einzige PstI-Schnittstelle von pKB4102 (im Ap^r-Gen) wurde PstI geschnittene 2-µm DNA aus BTYP-2 eingebaut.
Transformanten, die pHKB52 enthalten, zeigen den Phänotyp leu^+ Ap^s und Tet^s, während die Ausgangsplasmide BTYP-2 leu^- Ap^s Tet^r und pKB4102 leu^+ Ap^r Tet^s sind.

pL610, pL616, pL623 (Abb.3)
Zur Konstruktion dieser Plasmide wurde das Hefeplasmid 2-µmleu2, das die gesamte 2-µm DNA und das leu2-d Allel aus pJDB219 enthält und in E. coli nicht repliziert werden kann, limitiert mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und mit EcoRI verdautem pBR325 ligiert. Die gesuchten Plasmide pL610, pL616 und pL623 enthalten das gesamte 2-µm-leu2 Plasmid und pBr325 integriert in eine der beiden EcoRI-Schnittstellen der 2-µm DNA und haben den Phänotyp leu^+ Cm^s Ap^r Tet^r.
Die Plasmide pL610, pL616 und pL623 unterscheiden sich durch die Form der 2-µm DNA und die Integrationsstelle von pBR325 in eine der beiden EcoRI-Schnittstellen der 2-µm DNA. pL610 enthält Typ 23 der 2-µm DNA, und pBR325 ist integriert in die RIA-Schnittstelle der 2-µm DNA, pL616 enthält Typ 14 der 2-µm DNA und pBR325 in der RIB-Schnittstelle, pL623 enthält Typ 23 der 2-µm DNA, und pBR325 integriert in die RIB-Schnittstelle der 2-µm DNA.

pL72 (Abb.17)
In die SalI-Schnittstelle des Plasmids pMP80 (leu^+ Ap^r Tet^r Cm^s), die im Tetrazyklinresistenzgen von pBR325 auf diesem Plasmid liegt, wurde das SalI/XhoI-Fragment mit dem LEU2-Gen aus pYe10 (leu^+) integriert. Das gesuchte Plasmid pL72 ist an seinem Phänotyp leu^+ Ap^r Tet^s Cm^s zu erkennen.

YRp7-leu2-d (Abb.22)
In die PvuI-Schnittstelle von YRp7 (Ap^r Tet^r trp^+), die im Ampicillinresistenzgen liegt, wurde das 2,3 kb große PvuI-Fragment aus pJDB219 (leu^+ Tet^r), das das leu2-d Allel trägt, integriert. Das Plasmid YRp7-leu2-d im E. coli Stamm JA300 (leuB trpC) führt zum Phänotyp leu^+ trp^+ Tet^r Ap^s.

YRp7-LEU2 (Abb.22)
YRp7 wurde mit SalI geschnitten. In die einzige SalI-Schnittstelle

von YRp7, die im Tetrazyklinresistenzgen liegt, wurde das SalI/YhoI-Fragment mit dem LEU2-Gen aus pYe10 integriert. Transformanten des E. coli Stammes JA300 mit YRp7-LEU2 haben den Phänotyp leu^+ trp^+ Ap^r Tet^s.

2.10. E. coli Transformation (Mandel und Higa 1970)

20 ml einer E. coli Kultur, angezogen auf L-Broth, mit der Dichte A_{600} = 0,5, wurden abzentrifugiert, in 5 ml 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen und 20 min in Eis gestellt. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Zu 0,1 ml der $CaCl_2$-Zellen wurden 5 µl DNA gegeben und die Probe 30 min in Eis gestellt. Nach 5minütigem Hitzeschock bei 37 °C wurden 2 ml 37 °C warmes L-Broth-Medium zu der Zellsuspension gegeben und 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. 5 - 50 µl dieser Zellsuspension wurden auf L-Broth-Platten plus Antibiotikum ausplattiert.
Wurden die Transformanten auf Minimalmedium selektiert, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren einmal mit 5 ml 10 mM NaCl-Lösung gewaschen und danach in 0,5 ml NaCl-Lösung aufgenommen.
Pro ng Plasmid-DNA, wie zum Beispiel pBR325, sollte man 10^3 - 10^4 Transformanten erhalten.

2.11. Hefetransformation (Beggs 1978)

Zellen wurden in Vollmedium YEPD bis zur logarithmischen Phase (0,5 - 1 · 10^8 Zellen/ml) angezogen. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit H_2O gewaschen, in DTT-Lösung (1,2 M Sorbit, 25 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM DTT) aufgenommen und 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, zweimal mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in 15 ml Helicase-Puffer aufgenommen (1,2 M Sorbit, 10 mM EDTA, 0,1 M Na-Citrat (pH 5,8), 15 mg Helicase (L'Industrie Biologique Francaise, Clichy)), resuspendiert und unter leichtem Schütteln ca. 20 min bei 30 °C inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde kontrolliert, indem je 50 µl Zellsuspension in 1 ml 1,2 M Sorbit und 1 ml Aq. dest. pipettiert wurden. Durch Platzen der Protoplasten wurde die Wasserprobe klar, während die Sorbitlösung trüb blieb. Die Protoplasten wurden abzentrifugiert, zweimal mit 1,2 M Sorbit und einmal mit 1,2 M Sorbit/10 mM $CaCl_2$ gewaschen und schließlich

in 100 µl 1,2 M Sorbit/10 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Zu je 50 µl Protoplastensuspension wurden 5 µg Plasmid-DNA gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml PEG-Lösung (20 % Polyethylenglykol 4000, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) hinzugefügt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Protoplasten abzentrifugiert und dann in 100 µl 1,2 M Sorbit/10 mM $CaCl_2$ plus 50 µl YEPD/1,2 M Sorbit für 20 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Protoplasten wurden dann abzentrifugiert, einmal mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in 2 - 5 ml 1,2 M Sorbit vorsichtig resuspendiert.
5 - 100 µl der Protoplastensuspension wurden mit 5 ml Regenerations-Top-Agar (YNB-Medium plus 1,2 M Sorbit, 3 % Agar) vermischt und auf YNB-Platten mit 1,2 M Sorbit ausplattiert. Nach 2 - 5 Tagen Inkubation bei 30 °C hatten sich Transformantenkolonien entwickelt.

2.11.1. Nichtselektive Hefetransformation (Reipen 1982)

Die nichtselektive Hefetransformation entspricht der Methode für die Hefetransformation von Beggs (1978) mit folgenden Modifikationen:
Zum Regenerationsagar wurden 0,2 % Stärke und alle Aminosäuren oder Basen, die der Wirtsstamm zum Wachstum benötigt, hinzugefügt. Auf diesem Medium wuchsen alle regenerierten Zellen, daher mußte die Protoplastensuspension vor dem Ausplattieren 1:100 bis 1:1000 verdünnt werden.
Zur Identifizierung der Transformanten wurden, nachdem die Kolonien herangewachsen sind, die Platten mit 5,5 ml Soft-Indikatoragar (4 ml 1 % Agar von 40 °C wird vermischt mit 1,5 ml einer KJ/J_2-Lösung, die 3 mg Penicillin pro ml enthält) (Anderson und Lewis 1965, Chevallier und Aigle 1979), siehe auch 2.17., überschichtet. Die Platten wurden dann 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Bereits nach wenigen Stunden waren die Transformantenkolonien an einem deutlichen Halo leicht zu erkennen.

2.12. Nick-Translation

Die Nick-Translation wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Rigby et al. (1977) durchgeführt.
In einem Reaktionsvolumen von 25 µl waren enthalten:

20 µCi α-^{32}P-dCTP oder α-^{32}P-dATP (ca. 3000 Ci/mmol), je 2 µl 0,1 mM Lösungen von dGTP, dTTP, dATP bzw. dCTP, 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA, 5 ng/ml DNase, 1 µl DNA-Polymerase I (Boehringer, 3125 U/ml), 5 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM $MgCl_2$, 10 mM ß-Mercaptoethanol, 250 µg/ml Rinderserumalbumin.
Dieser Ansatz wurde 2 - 3 h bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Sarkosyllösung (10 %) abgestoppt. Anschließend wurde 20 µl tRNA aus E. coli (1 mg/ml) hinzugegeben. Die Probe wurde auf eine 5 - 7 ml Sephadex-Säule (Sephadex G50 gequollen in 0,1 x SSC) in einer 5 ml Pipette aufgetragen.
Die radioaktiv markierte Plasmid-DNA und die Mononucleotide wurden mit 6-7 ml 0,1 x SSC (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH7,0) eluiert und in 15-20 Fraktionen zu je 500 µl aufgefangen. Die radioaktiv markierte DNA war meist in den Fraktionen 3-5 enthalten.

2.13. Southern-Transfer

Zunächst wurde das Agarosegel zur Denaturierung der DNA-Fragmente im Gel 45 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl gelegt und danach zur Neutralisierung 50 min in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris-HCl (pH 7,0), 3 M NaCl). Nach der Methode von Southern (1975) wurde die DNA aus dem Agarosegel auf Nitrocellulosefilter (Schleicher und Schüll BA85, Porengröße 0,45 µm) übertragen mit 20 x SSC als Saugflüssigkeit. Vor dem Transfer wurde die Nitrocellulose 2 h in 10 x SSC und 30 min in 0,5 x SSC gewaschen. Der Transfer dauerte 20 h. Danach wurde der Nitrocellulosefilter 20 min in 2 x SSC gewaschen und anschließend 2 h bei 80 °C gebacken.

2.14. DNA-DNA-Hybridisierung

Nach dem Backen wurde der Filter in 6 x SSCP-Puffer plus 0,5 % SDS eingeweicht, kurz abgetropft und anschließend im gleichen Puffer, der radioaktiv markierte DNA mit der spezifischen Aktivität von 3 - 5 x 10^7 cpm/µg DNA in der Konzentration von etwa 10^6 cpm/ml enthielt, in einem Volumen von etwa 15 ml hybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 65 °C über Nacht durchgeführt. Danach wurde der Filter 1 h in 2 x SSCP plus 0,5 % SDS bei 60 °C gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. 20 x SSCP enthält: 140,3 g NaCl, 36,1 g KH_2PO_4, 80,2 g Na-Citrat, 7,4 g EDTA(Na_2), 11 g NaOH ad 1000 ml Aq. dest., pH 7,2.

2.15. Autoradiographie

Zur Autoradiographie wurden Kodak-X-Omat Röntgenfilme verwendet. Meistens wurden Intensifying Screens (DuPont) benutzt, um die Expositionszeit zu verkürzen. Die Exposition erfolgte bei -70 °C.

2.16. Hefe-Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierung wurde durchgeführt nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) mit Modifikationen von Hinnen et al. (1978).
Die Nitrocellulosefilter (Millipore HAWP) wurden einmal mit 1 x SSC und einmal mit Aq. dest. gewaschen. Die Filter wurden getrocknet, einzeln zwischen Whatman-Filterpapier gelegt und im Autoklaven sterilisiert. Dann wurden die Filter auf Agarplatten gelegt und Abstriche von Hefekolonien mit einem Zahnstocher aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert.
Die Kolonien wurden lysiert, indem die Filter nacheinander auf Filterpapier, das mit den folgenden Lösungen getränkt war, aufgelegt wurden: a) 50 mM EDTA, 0,35 M ß-Mercaptoethanol (pH 9,0) für 15 min, b) 1M Sorbit, 50 mM EDTA (pH 7,5) für 5 min, c) 1 M Sorbit, 50 mM EDTA (pH 7,5), 5 mg/ml Zymolyase 5000 (Kirin Brewery) für 2 - 3 h bei 37 °C, d) 0,2 M NaOH, 0,6 M NaCl für 1 min, e) 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,4) für 5 min, f) zweimal 2 x SSC. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Filter kurz abgetropft und leicht angetrocknet.
Zum Schluß wurden die Filter etwa 20 h bei 80 °C gebacken. Die so behandelten Filter wurden mit radioaktiv markierter DNA hybridisiert wie unter 2.14. angegeben.

2.17. Qualitativer Nachweis der ß-Lactamase-Aktivität in Hefetransformanten (Anderson und Lewis 1965, Chevallier und Aigle 1979)

Ausstriche von Hefekolonien wurden auf Stärkeplatten (0,65 % Yeast Nitrogen Base, 0,1 % Glucose, 0,2 % lösliche Stärke, 0,02 M Phosphatpuffer (pH 6-7), 2 % Agar) 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert.
Danach wurden die Platten mit einem Gemisch aus 4 ml Softagar (gleiche

Zusammensetzung wie der Nährboden, aber 1 % Agar) und 1,5 ml Jod-Penicillin-Reagenz (3 mg/ml J_2, 15 mg/ml KJ, 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7), 3 mg/ml Ampicillin (kurz vor Gebrauch zugeben)) überschichtet und 1 h bei 30 °C und anschließend bei 4 °C inkubiert.
ß-Lactamase-positive Zellausstriche waren zu erkennen an der Entfärbung des dunkelblauen Mediums, die abhängig von der ß-Lactamase-aktivität 1 - 24 h nach Auftragen des Reagenzes auftrat.

2.18. Bestimmung der ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität in Hefe

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte in Anlehnung an Kohlhaw et al. (1980). Die Hefezellen wurden auf Minimalmedium YNB plus 1 g $(NH_4)_2SO_4$/l bis zur spätlogarithmischen Phase (2 x 10^8 Zellen/ml) angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal in Phosphatpuffer (0,1 M Kaliumphosphat (pH 6,9), 1,25 M $(NH_4)_2SO_4$) gewaschen. Nach Bestimmung des Naßgewichts wurden die Zellen in 2 ml Phosphatpuffer pro g Zellen und 2 g Glasperlen (0,45 mm Ø) aufgenommen und im Braun-Homogenisator 1 min auf Stufe 2 unter Kühlung durch CO_2-Begasung aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde dann 30 min bei 10 000 rpm im Beckman-Rotor JS13 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Rohextrakt zur Messung der Enzymaktivität eingesetzt.
Die Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase wurde bestimmt nach Parsons und Burns (1970) über die Bildung von NADH, die durch Extinktionszunahme bei 340 nm im Spektralphotometer PM6 (Zeiss) verfolgt wurde. Versuchstemperatur war 30 °C.
Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml:
150 µl 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0), 50 µl 1 M KCl, 50 µl 10 mM $MgCl_2$, 100 µl 10 mM NAD, 50 µl ß-Isopropylmalat (1:3 verdünntes Rohprodukt, ca. 10 mM), 50 µl Rohextrakt und 550 µl Aq. dest.
ß-Isopropylmalat wurde als Rohprodukt verwendet, das freundlicherweise von Herrn Dr. Dickop nach der Methode von Calvo et al. (1962) synthetisiert wurde.
Zur Proteinbestimmung (Lowry et al. 1951) wurden die Rohextrakte nach der Enzymbestimmung 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt und je 10, 20 und 50 µl aus diesen Verdünnungen eingesetzt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

2.19. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung des 5' Endes des leu2-d Fragments wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) mit Abänderungen von Dahlems (1983) durchgeführt.
Zunächst wurde die DNA am 3' Ende radioaktiv markiert. Zur 3' Endmarkierung wurde für 5 - 10 µg DNA folgender Reaktionsansatz benutzt: 0,2 Einheiten Klenow-Fragment (Boehringer), 0,8 µl 10 mM dTTP, 0,8 µl 10 mM dGTP, 20 µCi α-^{32}P-dATP, 20 µCi α-^{32}P-dCTP, 5 µl 5 x konz. Polymerasepuffer (0,25 M Tris-HCl (pH 7,8), 25 mM $MgCl_2$, 50 mM ß-Mercaptoethanol, 250 µg/ml Rinderserumalbumin) und mit Aq. dest. aufgefüllt auf 25 µl Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 1 h inkubiert und die Reaktion dann abgestoppt durch 5 min bei 65 °C. Die radioaktiv markierte DNA wurde in einer Sephadex-Säule (Sephadex G75, gequollen in 10 mM $(NH_4)HCO_3$), die vorher mit 30 µg phenolgereinigter tRNA abgesättigt worden war, abgetrennt. Es wurden 20 Fraktionen aufgefangen: Probe 1 enthielt 15 Tropfen, alle anderen Fraktionen je 3 Tropfen des Eluates. Die DNA befand sich in den Proben 3 - 5.
Die markierte DNA wurde mit Restriktionsenzymen nachgeschnitten und die DNA-Fragmente auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das DNA-Fragment, das sequenziert werden sollte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) aus dem Polyacrylamid eluiert, nach Isopropanolfällung mit 0,3 M Natriumacetat gewaschen und schließlich mit Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 30 µl H_2O pro 100 000 cpm gelöst. Je 10 µl davon wurden für die Identifizierung von A+G und C+T, je 5 µl für die Identifizierung von G und C eingesetzt.

DNA-Spaltungsreaktionen:
Die angegebenen Reaktionszeiten gelten für DNA-Fragmente, die 200 - 400 bp enthalten.

1) G: 5 µl DNA-Probe + 200 µl Natriumkakodylatpuffer (50 mM Natriumkakodylat (pH 8,0), 1 mM EDTA) + 2 µl DMS, 30 sec bei Raumtemperatur, + 50 µl DMS-Stop.

2) A+G: 10 µl DNA-Probe + 25 µl 66 %ige Ameisensäure, 10 min bei 37 °C, + 50 µl 32 %ige NaOH.

3) C+T: 10 µl DNA-Probe + 10 µl H_2O + 30 µl 95 %iges Hydrazin, 3,5 min bei Raumtemperatur, + 200 µl Hydrazin-Stop.

4) C: 5 µl DNA-Probe + 15 µl 5 M NaCl + 30 µl 95 %iges Hydrazin, 5 min bei Raumtemperatur, + 200 µl Hydrazin-Stop.

Nach Zugabe der einzelnen Lösungen wurden die Proben immer gut gemischt. Nach dem Abstoppen wurden die Proben dann in Eis gestellt und anschließend zusammen aufgearbeitet.
Die DNA-Proben wurden mit Ethanol gefällt, in 0,3 M Natriumacetat aufgenommen, wieder mit Ethanol gefällt und danach zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Die getrockneten DNA-Pellets wurden dann in je 50 µl 1 M Piperidin (frisch verdünnt) gelöst und 1 h bei 90 °C inkubiert. Die abgekühlten Proben wurden über Nacht im Vakuum eingedampft. Die Pellets wurden dann in 80 %iger Formamidlösung (1 mM EDTA, 10 mM NaOH) mit einigen Krümeln Bromphenolblau/Xylencyanol als Farbmarkern aufgenommen (2000 cpm/µl). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 1 - 2 min bei 90 °C denaturiert und in Eis schnell abgekühlt.
Von jeder der vier Proben wurden etwa 5000 cpm auf 8 oder 16 %ige Polyacrylamidgele, die 2 h bei 800 V vorgelaufen waren, aufgetragen. Die Sequenziergele hatten die Maße 0,4 mm x 38 cm x 21 cm mit 1,1 cm breiten Auftragestellen. Die DNA-Fragmente wurden bei 1700 V (16 %iges Gel) oder 1200 V (8 %iges Gel) aufgetrennt.
Die Gele wurden anschließend mit oder ohne Intensifying Screen (DuPont) bei - 70 °C für mehrere Tage exponiert.

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen wurden folgende Lösungen verwendet:

a) Acrylamid-Stammlösung (30 %): 290 g Acrylamid, 10 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid ad 1000 ml H_2O

b) 10 x TBE-Puffer: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 9 g EDTA ad 1000 ml H_2O

c) 12 %ige Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS)

d) N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)

Die Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

Gel	Lösung a)	Lösung b)	H_2O
6 %	20 ml	10 ml	69,5 ml
8 %	26,6 ml	10 ml	62,9 ml
16 %	53,2 ml	10 ml	36,3 ml

Denaturierende Gele, wie die Sequenziergele, enthielten außerdem 7 M Harnstoff.

Die Polymerisation der Gele (je 100 ml) wurde durch Zugabe von 0,5 ml APS und danach 70 µl TEMED gestartet. Die Gele polymerisierten über Nacht.

Als Elektrophoresepuffer für Polyacrylamidgele wurde 1 x TBE-Puffer (siehe Lösung b) verwendet. Der pH-Wert war pH 8,3 (stellt sich von selbst ein).

3. Ergebnisse

3.1. Stabilität von Rekombinantplasmiden in Hefe

Die Stabilität von 2-µm DNA-Vektoren in Hefe hängt von mehreren Faktoren ab.
(1) Sie kann beeinflußt werden von den drei funktionell unterschiedlichen DNA-Bereichen auf dem Rekombinantplasmid selbst: dem 2-µm DNA-Fragment, dem selektiven Marker und dem bakteriellen Vektor.
(2) Die Anwesenheit endogener 2-µm DNA in der Zelle kann die Stabilität beeinflussen. So kann die 2-µm DNA die Stabilität von 2-µm DNA-Vektoren erhöhen, indem die in trans aktiven REP Genprodukte der 2-µm DNA (Broach et al. 1981) die stabile Replikation und Transmission von Plasmiden bewirken können, die die REP Gene nicht auf ihrem 2-µm DNA-Fragment enthalten. Eine andere Möglichkeit ist, daß die 2-µm DNA einen negativen Effekt auf die Stabilität von Rekombinantplasmiden ausübt. Diese Wirkung könnte durch Inkompatibilität zwischen endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen, die den gleichen Replikationsmodus besitzen, hervorgerufen werden. Unterschiede in der Größe und den 2-µm DNA-Sequenzen zwischen einem Rekombinantplasmid und endogener 2-µm DNA sowie die Wachstumsbedingungen könnten einen Einfluß darauf haben, welches der beiden Plasmide bevorzugt repliziert wird.
(3) Es kann zur Rekombination zwischen endogener 2-µm DNA und dem Rekombinantplasmid über homologe 2-µm DNA-Sequenzen kommen. Dadurch könnte ein neues Rekombinantplasmid entstehen, das eine höhere Stabilität als das ursprüngliche aufweist.
In den folgenden Experimenten wird untersucht, welche Parameter die Stabilität von Rekombinantplasmiden beeinflussen. Die Stabilität von Plasmiden, die sich im 2-µm DNA-Fragment, dem selektiven Marker oder dem bakteriellen Vektor unterscheiden, wird untersucht. Der Einfluß endogener 2-µm DNA auf die Stabilität von Rekombinantplasmiden wird analysiert,

indem die Stabilität verschiedener Plasmide im CIR^+ und einem isogenen cir^o Stamm verglichen wird.

3.1.1. Hefetransformation

Die Hefetransformation wurde nach der Methode von Beggs (1978) durchgeführt. Die Transformanten wurden unter selektiven Bedingungen auf Minimalmedium ohne Leucin, Histidin oder Tryptophan durch Komplementation der leu2, his3 oder trp1 Mutation der verschiedenen Wirtsstämme durch die entsprechenden Wildtypgene auf den Plasmiden isoliert. Die Transformationsraten für die CIR^+ Stämme AH22, GRF18, YNN27 und den cir^o Stamm YT6-2-1L lagen bei etwa 10^4 Transformanten pro µg Plasmid-DNA. Die Transformationsfrequenz pro regenerierter Hefezelle lag bei etwa 10^{-3}. Unterschiede in der Transformationsfrequenz in Abhängigkeit vom Rekombinantplasmid wurden nicht festgestellt.

3.1.2. Nachweis der Plasmide in Hefe

Es wurden verschiedene Methoden miteinander kombiniert, um Plasmide in Hefezellen nachzuweisen:
(1) Selektion auf Markergene
Die hier untersuchten Plasmide tragen als selektive Marker das LEU2, HIS3 oder TRP1 Gen aus Hefe. Die Anwesenheit dieser Gene wurde durch Komplementation der entsprechenden Mutationen der Wirtsstämme zu Leucin-, Histidin- oder Tryptophan-Prototrophie nachgewiesen. Dazu wurden Kolonien, die auf Vollmedium gewachsen waren, auf Platten mit Minimalmedium ohne Leucin, Histidin oder Tryptophan ausgestrichen.
(2) Qualitative Bestimmung der ß-Lactamase-Aktivität
Die meisten der hier untersuchten Rekombinantplasmide enthalten als bakterielle Vektoren pBR322 oder pBR325 mit dem Ampicillin-Resistenzgen (bla Gen), das in Hefe exprimiert wird (Hollenberg 1979). Ausstriche von ß-Lactamase positiven Hefetransformanten bilden auf den tiefblauen Indikatorplatten einen farblosen Halo (Abb. 2a).

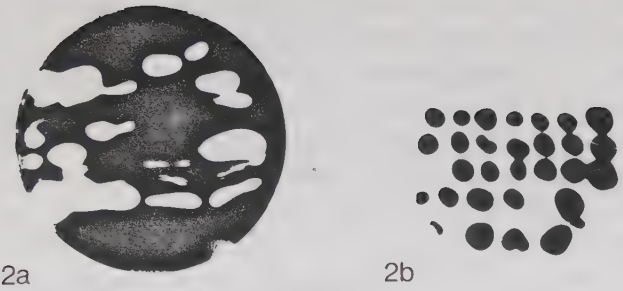


Abb. 2 Ausstriche von AH22(pMP78) Transformantenkolonien nach nichtselektivem Wachstum auf:
a. ß-Lactamase-Indikatorplatten, Bla^+ Kolonien entfärben das Medium, bla^- Kolonien nicht.
b. Nitrocellulosefiltern und anschließender Hybridisierung mit ^{32}P-BTYP-2 DNA. Das Autoradiogramm zeigt 25 positive und 3 negative Kolonien. Kontrollen: 4 cir^o Kolonien oben, 4 CIR^+ Kolonien unten auf dem Filter.

(3) Koloniehybridisierung

Das Vorhandensein von endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Plasmiden in transformierten Hefezellen wurde außerdem durch Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierter BTYP-2 DNA nachgewiesen. BTYP-2 enthält die gesamte 2-µm DNA und pBR322. Kolonien, die mit BTYP-2 hybridisierende Plasmide enthalten, sind auf dem Autoradiogramm als schwarze Flecken zu erkennen, Kolonien ohne solche Plasmide zeigen keine Reaktion (Abb. 2b).

3.1.3. Stabilität verschiedener Rekombinantplasmide in CIR^+ Stämmen

Zur Untersuchung der Segregation verschiedener Rekombinantplasmide unter nichtselektiven Wachstumsbedingungen wurden einzelne Transformantenkolonien von Minimalmedium auf Vollmedium überimpft und 50 Generationen lang angezogen. Zum Zeitpunkt des Animpfens und jeweils nach 10 Generationen

wurden Proben entnommen und so verdünnt, daß pro Platte 50-200 Zellen auf Voll- und Minimalmedium ausplattiert wurden. Der Anteil der Zellen, die auf Minimalmedium Kolonien bilden, also noch die Aminosäure-Auxotrophie des Wirtsstammes komplementieren, gibt an, wieviel Prozent der Zellen den Selektivmarker des Rekombinantplasmids und damit das Plasmid enthalten, wie durch Koloniehybridisierung und durch DNA-Analyse nach Southern überprüft wurde. Integration von Plasmidsequenzen ins Hefegenom wurde sehr selten beobachtet.

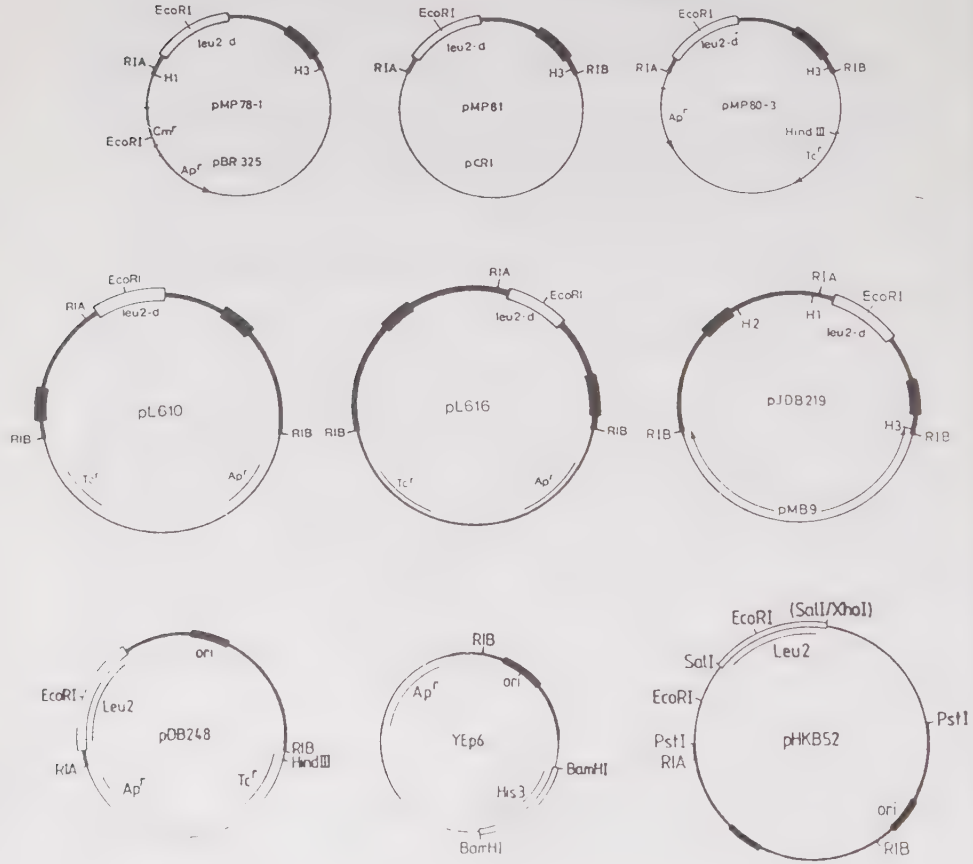


Abb. 3 Restriktionskarten der Rekombinantplasmide, deren Stabilität untersucht wurde. Breite Linien (2-µm DNA-Sequenzen), dünne Linien (bakterieller Vektor).

3.1.3.1. Einfluß der 2-µm DNA-Sequenzen

Es wurde die Stabilität von Plasmiden untersucht, die sich nur im 2-µm DNA-Teil unterscheiden. Die Plasmide pL610 und pL616 (Abb. 3), die beide die gesamte 2-µm DNA enthalten, wurden miteinander verglichen. Der Unterschied zwischen pL610 und pL616 ist, daß pL610 Typ 23 und pL616 Typ 14 der 2-µm DNA enthält. Aus Tab. 1 geht hervor, daß diese beiden Rekombinantplasmide die gleiche Stabilität von 1,0 % Verlust an transformierten Zellen pro Generation aufweisen. Daraus kann man schließen, daß es für die Stabilität von 2-µm DNA-Vektoren im CIR^+ Stamm unwesentlich ist, welche der beiden Formen der 2-µm DNA auf dem Rekombinantplasmid vorliegt.
In Tab. 1 wird weiterhin die Stabilität zweier Plasmide miteinander verglichen, die nur einen Teil der 2-µm DNA tragen: pMP78 enthält das HindIII-Fragment 3 und pMP80 das EcoRI-Fragment 4 der 2-µm DNA (Abb. 3). Diese beiden Fragmente enthalten nur die 2-µm DNA-Replikationsstartstelle, aber keine REP Gene. Außerdem haben sie ungefähr die gleiche Länge, die DNA-Sequenzen sind größtenteils identisch und unterschei-

Tab. 1 Stabilität von Rekombinantplasmiden mit verschiedenen 2-µm DNA-Sequenzen im CIR^+ Stamm AH22 während des Wachstums auf Vollmedium YEPD in % Verlust an transformierten Zellen pro Generation (Fehlergrenze ± 0,2%).

Rekombinant-plasmid	2-µm DNA-Fragment	Verlust (%)
pL610	gesamte Typ 23	1,0
pL616	gesamte Typ 14	1,0
pMP78	HindIII-3	1,6
pMP80	EcoRI-4	1,6

den sich in kurzen DNA-Sequenzen an den beiden Enden (vergl. Abb. 1). AH22(pMP78) und AH22(pMP80) Transformanten weisen einen Verlust von 1,6 % an transformierten Zellen pro Generation auf. Die Stabilität von pMP78 und pMP80 ist im CIR^+ Stamm gleich, die geringen Unterschiede der 2-µm DNA-Sequenzen auf diesen Plasmiden haben keine Auswirkung auf die Stabilität.
Aus Tab. 1 kann man ersehen, daß die Plasmide mit gesamter 2-µm DNA, pL610 und pL616, stabiler sind als pMP78 und pMP80, die nur ein 2-µm DNA-Fragment mit dem Replikationsstartbereich enthalten. Das ist darauf zurückzuführen, daß nur die Rekombinantplasmide mit gesamter 2-µm DNA die REP Gene enthalten, die für stabile Replikation und den Erhalt der Plasmide in hoher Kopienzahl erforderlich sein sollen (Broach et al. 1981).

3.1.3.2. Einfluß des bakteriellen Vektors

Um die Wirkung des bakteriellen Vektors auf die Stabilität von Rekombinantplasmiden festzustellen, wurden Plasmide untersucht, die sich nur im bakteriellen DNA-Teil unterscheiden. Die Plasmide pL616 und pJDB219 enthalten als bakterielle DNA pBR325 und pMB9. Von der Größe her sind diese bakteriellen Plasmide etwa gleich: pBR325 ist 6,0 kb und pMB9 5,4 kb groß, sie unterscheiden sich aber in ihren DNA-Sequenzen. Wie die Ergebnisse in Tab. 2 zeigen, weisen pJDB219 und pL616 die gleiche Stabilität auf. Die bakteriellen Vektoren pBR325 und pMB9 verändern die Stabilität offensichtlich nicht.
Als zweites Beispiel dafür, daß die Wahl des bakteriellen Vektors die Stabilität von 2-µm DNA-Rekombinantplasmiden nicht beeinflußt, kann man in Tab. 2 pMP80 und pMP81 vergleichen. Das Plasmid pMP81 trägt als bakteriellen Vektor pCR1, der mit einer Länge von ca. 13 kb mehr als doppelt so groß wie pBR325 (6 kb) auf pMP80 ist. Trotz des beträchtlichen Größenunterschiedes zwischen pCR1 und pBR325 weisen pMP80 und pMP81 eine ähnliche Stabilität im Wirtsstamm AH22 auf (Tab. 2).
Nach den Ergebnissen in Tab. 2 übt also die bakterielle DNA

auf Rekombinantplasmiden mit dem 2-µm DNA-Replikon kaum einen Einfluß auf die Stabilität solcher Plasmide in Hefe aus.

Tab. 2 Stabilität von Rekombinantplasmiden mit verschiedenen bakteriellen Vektoren im CIR$^+$ Stamm AH22 während des Wachstums auf Vollmedium YEPD in % Verlust an transformierten Zellen pro Generation (Fehlergrenze ±0,2%).

Rekombinant-plasmid	bakterieller Vektor	2-µm DNA-Fragment	Verlust (%)
pJDB219	pMB9	gesamte	1,0
pL616	pBR325	gesamte	1,0
pMP80	pBR325	EcoRI-4	1,6
pMP81	pCR1	EcoRI-4	1,7

3.1.3.3. Einfluß des selektiven Markers

Der dritte der unterschiedlichen DNA-Bereiche auf einem rekombinanten 2-µm DNA-Plasmid, der die Stabilität beeinflussen könnte, ist das DNA-Fragment mit dem selektiven Markergen. In diesem Abschnitt wird die Stabilität von Rekombinantplasmiden in Abhängigkeit vom selektiven Markergen und von verschiedenen Allelen des LEU2 Gens untersucht.
Im Stamm GRF18, der isogen mit AH22 ist, wurde die Stabilität der Plasmide pMP78 und YEp6 miteinander verglichen. Das Plasmid mit dem leu2-d Allel, pMP78, zeigt eine erheblich höhere Stabilität als das Plasmid YEp6 mit dem HIS3 Gen. YEp6 geht doppelt so schnell verloren wie pMP78 (Tab. 3).
Um zu untersuchen, ob Plasmide mit dem LEU2 Gen als selektiven Marker generell stabiler sind als Plasmide mit anderen Markern, wurde die Stabilität von Plasmiden mit verschiedenen LEU2 Allelen miteinander verglichen.
Es gibt drei unabhängig voneinander klonierte DNA-Fragmente die das LEU2 Gen tragen. (1) Als leu2-d Allel wird ein 1,3 kb DNA-Fragment mit dem LEU2 Gen bezeichnet, das von Beggs

Tab. 3 Stabilität von Rekombinantplasmiden mit verschiedenen selektiven Markern im CIR$^+$ Stamm AH22 oder im isogenen CIR$^+$ Stamm GRF18 während des Wachstums auf Vollmedium YEPD in % Verlust an transformierten Zellen pro Generation (Fehlerbreich ±0,2%).

Rekombinant-plasmid	selektiver Marker	2-µm DNA-Fragment	Verlust (%)
pMP78	leu2-d	HindIII-3	1,6
YEp6	HIS3	HindIII-3	3,2
pJDB219	leu2-d	gesamte	1,0
pHKB52	LEU2 aus pYe10	gesamte	1,4
pMP78	leu2-d	HindIII-3	1,6
pDB248	LEU2 aus pJDB248	EcoRI-2	1,7

(1978) in pJDB219 kloniert wurde. (2) Das LEU2 Fragment auf pHKB52 ist 2,2 kb groß, ist abgeleitet von dem Plasmid pYe10 und kommt ursprünglich aus dem Wildstamm S288c (Hinnen et al. 1978). (3) Das LEU2 Allel auf pDB248 ist ein 2,4 kb großes DNA-Fragment, das ursprünglich auf pJDB248 kloniert wurde (Beggs 1978). Das LEU2 Fragment auf pDB248 und das leu2-d Fragment sind beide aus dem Stamm MC16 isoliert worden. Vergleicht man in Tab. 3 die Stabilität von pJDB219 und pHKB52 miteinander, die verschiedene LEU2 Allele tragen, zeigt sich, daß pJDB219 mit dem leu2-d Allel erheblich stabiler ist als pHKB52 mit dem LEU2 Allel aus pYe10.
Kaum einen Unterschied in der Stabilität zeigen die beiden Plasmide pDB248 und pMP78 (Tab. 3), die ebenfalls verschiedene LEU2 Allele tragen.

3.1.3.4. Eigenschaften von Transformanten mit leu2-d Plasmiden

Bei der Durchführung der Stabilitätsbestimmung zeigte sich, daß Transformanten, die Plasmide mit dem leu2-d Allel enthielten, mehrere typische Unterschiede zu Transformanten auf-

wiesen, die Plasmide mit anderem Markergen oder den anderen LEU2 Allelen trugen:

(a) Transformanten mit leu2-d Plasmiden hatten eine längere Generationszeit auf Minimalmediumplatten. AH22 oder GRF18 Zellen transformiert mit pMP78 und anderen Plasmiden mit dem leu2-d Marker benötigten 3-5 Tage, um auf Minimalmedium Kolonien zu bilden. Charakteristisch war weiterhin, daß die Größe der Kolonien recht unterschiedlich war. Transformanten, die Plasmide mit anderen Markergenen oder den LEU2 Fragmenten aus pYe10 oder pJDB248 trugen, hatten Kolonien von einheitlichem Durchmesser bereits nach 2-3 Tagen gebildet. In Minimalmedium-Flüssigkultur konnten keine Wachstumsunterschiede festgestellt werden.

(b) Weiterhin wurde beobachtet, daß Transformanten mit leu2-d Plasmiden eine höhere ß-Lactamase-Aktivität aufwiesen als Transformanten, deren Plasmide andere selektive Marker trugen. Dies zeigte sich an der Größe des entfärbten Hofes auf den ß-Lactamase-Indikatorplatten.

(c) Der Nachweis der Plasmide in Hefetransformanten über Markergenanalyse, Bestimmung der ß-Lactamase-Aktivität und Koloniehybridisierung mit einer 2-µm DNA-Probe zeigte, daß Transformanten mit leu2-d Plasmiden oft die endogene 2-µm DNA verloren hatten und sogenannte cir^0 Zellen geworden waren. Solche Kolonien zeigten den Phänotyp leu^- bla^- und hybridisierten nicht mehr mit der 2-µm DNA-Probe. Offensichtlich hatten diese Zellen nicht nur das Rekombinantplasmid sondern auch alle endogenen 2-µm DNA-Moleküle verloren. Mit zunehmender Segregation der leu2-d Plasmide während des nichtselektiven Wachstums auf Vollmedium nahm auch der Anteil an cir^0 Zellen stetig zu. Dagegen zeigten Transformanten, die Plasmide mit anderen Markern als das leu2-d Allel enthielten, nach Verlust des Rekombinantplasmids ein anderes Bild. Aminosäuremarker$^-$ und bla^- Abkömmlinge von diesen Transformanten hybridisierten meist noch mit der 2-µm DNA-Probe. Solche Kolonien hatten nur das Rekombinantplasmid verloren, aber enthielten noch endogene 2-µm DNA.

3.1.4. Stabilität verschiedener Rekombinantplasmide im cir^{o} Stamm YT6-2-1L

Um den Einfluß der 2-µm DNA, besonders der in trans wirkenden REP Gene (Broach et al. 1981), auf die Stabilität von Rekombinantplasmiden in Hefe zu untersuchen, wurde die Stabilität verschiedener 2-µm DNA-Vektoren unter nichtselektiven Bedingungen im cir^{o} Stamm YT6-2-1L bestimmt. YT6-2-1L ist abgeleitet von AH22(pMP78). Der einzige Unterschied zu AH22 ist das Fehlen der 2-µm DNA.
Die Stabilitätsbestimmung wurde durchgeführt wie unter 3.1.2. und 3.1.3. für CIR^{+} Stämme angegeben. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Das Plasmid pMP78, das ein 2-µm DNA-Fragment nur mit dem Replikationsstartpunkt enthält, und das Plasmid pDB248, das ein 2-µm DNA-Fragment mit dem Replikationsstartbereich und dem REP2 Gen trägt, können in YT6-2-1L nicht stabil repliziert und auf Tochterzellen weitergegeben werden. Nach Wachstum auf Vollmedium hatten alle Zellen innerhalb weniger Generationen alle Plasmidmoleküle verloren (Tab. 4). Die Plasmide pJDB219 und pHKB52, die die gesamte 2-µm DNA enthalten, sind wesentlich stabiler und segregieren sogar langsamer aus als im CIR^{+} Stamm AH22 (vergl. Tab. 3).

Tab. 4 Stabilität von Rekombinantplasmiden im cir^{o} Stamm YT6-2-1L während des Wachstums auf Vollmedium YEPD in % Verlust an transformierten Zellen pro Generation (Fehlerbereich ±0,2 %)

Plasmid	2-µm DNA-Fragment	selektiver Marker	Verlust (%)
pMP78	HindIII-3	leu2-d	20
pDB248	EcoRI-2	LEU2/pJDB248	20
pJDB219	gesamte	leu2-d	0,7
pHKB52	gesamte	LEU2/pYe10	1,0

Höhere Stabilität von Rekombinantmolekülen mit gesamter 2-µm DNA im cir^{O} Stamm als im CIR^{+} Stamm beobachteten auch Blanc et al. (1979) mit Plasmiden, die URA3 als selektiven Marker trugen. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß im cir^{O} Stamm keine Konkurrenz zwischen rekombinanten und endogenen 2-µm DNA-Molekülen um das Replikations- und Transmissionssystem der 2-µm DNA besteht. In den (YT6-2-1L)Transformanten mit pHKB52 und pJDB219 liegen nur Rekombinantplasmide vor.

Die Instabilität von pMP78 und pDB248 in YT6-2-1L ist auf das Fehlen der REP Genprodukte in diesen Zellen zurückzuführen (Broach et al. 1981). Das REP2 Gen, das auf pDB248 vorkommt, reicht anscheinend allein nicht aus, um den Erhalt von pDB248 in YT6-2-1L zu bewirken. Das Plasmid pDB248 ist genauso instabil wie pMP78, das kein REP Gen besitzt (Tab. 4).

Unter selektiven Wachstumsbedingungen führte die Instabilität von pMP78 und pDB248 in YT6-2-1L zum langsameren Wachstum dieser Transformanten im Vergleich zu AH22(pMP78) und AH22 (pDB248). Dieses Phänomen sollte auf dem ständigen Verlust an pMP78 oder pDB248 Molekülen beruhen.

In Abb. 4 ist EcoRI verdaute Plasmid-DNA aus den verschiedendenen in Tab. 4 aufgelisteten (YT6-2-1L)Transformanten im Vergleich zu den entsprechenden (AH22)Transformanten dargestellt. Die DNA wurde aus selektiv angezogenen Zellen isoliert. Als Hybridisierungsprobe diente radioaktiv markierte pL623 DNA, die die gesamte 2-µm DNA, pBR325 und das leu2-d Fragment enthält, und mit allen DNA-Sequenzen der 2-µm DNA und der Rekombinantplasmide im gleichen Maße hybridisiert. Aus Abb. 4 kann man ersehen, daß die Plasmid DNA-Banden von pMP78 (Abb. 4, Pos. H) und pDB248 (Abb. 4, Pos. F) im cir^{O} Stamm YT6-2-1L kaum zu erkennen sind, was zeigt, daß sie in geringerer Kopienzahl als im CIR^{+} Stamm AH22 vorkommen. Die Plasmide pJDB219 (Abb. 4, Pos. G) und pHKB52 (Abb. 4, Pos. E) liegen in YT6-2-1L hingegen in etwas höherer Kopienzahl als in AH22 vor, wie die Intensitätsunterschiede der DNA-Banden zeigen (Abb. 4).

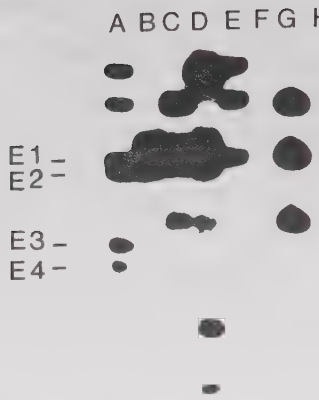


Abb. 4 Autoradiogramm EcoRI verdauter DNA aus verschiedenen selektiv angezogenen Transformanten. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-pL623 DNA. E1-E4 sind die EcoRI-Banden der 2-µm DNA. A: AH22(pHKB52), B: AH22(pDB248), C: AH22 (pJDB219), D: AH22(pMP78), E: YT6-2-1L(pHKB52), F: YT6-2-1L(pDB248), G: YT6-2-1L(pJDB219), H: YT6-2-1L (pMP78).

Die Stabilitätsbestimmungen zeigen, daß Rekombinantplasmide, die nicht stabil repliziert werden können und in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen wie pDB248 und pMP78, schneller aus YT6-2-1L aussegregieren als die Plasmide pJDB 219 und pHKB52, die in hoher Zahl pro Zelle vorliegen.

3.1.5. Rekombination zwischen endogener 2-µm DNA und pMP78

Rekombination zwischen endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen wurde von mehreren Autoren beschrieben (Beggs 1978, Storms et al. 1979, Gerbaud et al. 1979, McNeil et al. 1980, Dobson et al. 1980b, Thomas und James 1980). Man nimmt an, daß zunächst ein Cointegrat aus Rekombinantplasmid und endogener 2-µm DNA gebildet wird. Durch ein zweites Crossover wird dieses Molekül wieder in zwei Plasmide gespalten.

Die Rekombination kann über die IR-Regionen der 2-µm DNA und/oder andere homologe Sequenzen ablaufen.
Bei den Stabilitätsbestimmungen an AH22(pMP78) Transformanten wurden Kolonien entdeckt, die nur noch einen Teil der ursprünglichen Plasmide 2-µm DNA und pMP78 enthielten. So waren etwa 5 % der untersuchten AH22(pMP78) Kolonien bla^-, aber Leu^+ und hybridisierten mit der 2-µm DNA-Probe. Zellen dieses Phänotyps auf Vollmedium angezogen, waren sehr stabil. Nach 50 Generationen waren noch etwa 80 % der Zellen bla^-, Leu^+ und somit viel stabiler als Bla^+ Leu^+ Transformanten, die nach 50 Generationen auf Vollmedium nur 20 % Leu^+ Zellen enthielten.
Aus einigen solcher stabilen bla^- Leu^+ AH22(pMP78) Zellen wurde DNA isoliert und nach der Methode von Southern analysiert. In Abb. 5, E ist die DNA einer typischen stabilen Kolonie unverdaut und mit HindIII verdaut aufgetragen. Die Hybridisierung mit einer 2-µm DNA/pBR325-Probe (BTYP-2 DNA) zeigt, daß diese Kolonie ein neues Plasmid enthält, dessen Supercoil-Bande größer als die der 2-µm DNA aber kleiner als die von pMP78 ist. Vergleicht man die DNA-Banden nach HindIII-Verdauung mit denen eines normalen AH22(pMP78) Transformanten (Abb. 5, C) und einem Kontrollgemisch aus pMP78 und 2-µm DNA (Abb. 5, A) und 2-µm DNA allein (Abb. 5, B), stellt man fest, daß die DNA in Abb.5, E nicht die pBR325-Bande von pMP78 enthält. Außerdem fehlen die HindIII-Fragmente 1 und 3 der 2-µm DNA. Stattdessen gibt es die zwei größeren HindIII-Fragmente 1-leu2 und 3-leu2. Dieser Transformant, dessen DNA in Abb. 5, E dargestellt ist, enthält nur ein Plasmid, das aus gesamter 2-µm DNA und dem leu2-d Fragment aus pMP78 besteht. Wie die endogene 2-µm DNA liegt dieses Plasmid, 2-µmleu2 genannt, in zwei Formen vor, deren Mengen äquimolar sind. Die Bildung von 2-µmleu2 wurde zuerst von Dobson et al. (1980b) in CIR^+ Zellen nach Transformation mit pJDB219 beobachtet.
Neben AH22(pMP78) Transformanten, deren einziges Plasmid 2-µmleu2 ist, gibt es aber auch solche, die sowohl 2-µmleu2 als auch pMP78 enthalten (Abb. 5, F). Diese Moleküle liegen möglicherweise als Cointegrat vor, wie die Probe mit unverdauter DNA in Abb. 5, F zeigt: Es gibt nur eine Super-

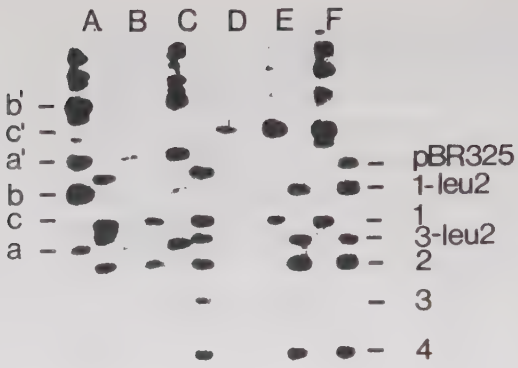


Abb. 5 Autoradiogramm HindIII verdauter (rechts) und unverdauter DNA (links) verschiedener AH22(pMP78) Kolonien. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-BTYP-2. Das HindIII-Fragment 5 der 2-µm DNA ist nicht zu sehen. 1-4 sind die HindIII-Fragmente der 2-µm DNA, pBR und 3-leu2 sind pMP78 Banden, 1-leu2 entsteht nach Rekombination zwischen 2-µm DNA und pMP78. a,a´, b,b´und c,c´sind die supercoiled und relaxierten Formen der unverdauten Plasmide 2-µm DNA, pMP78 und 2-µmleu2.

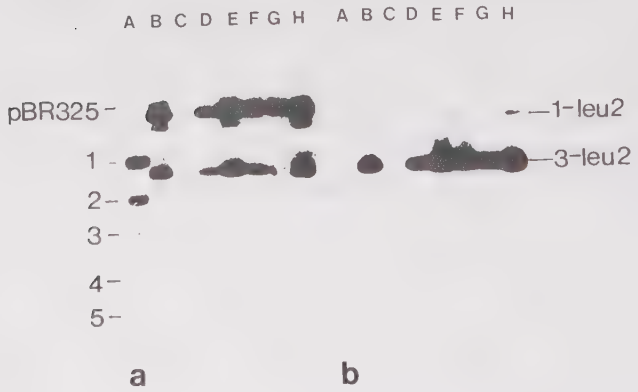


Abb. 6 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus AH22(pMP78) Transformanten (B-H) und AH22 (A). 1-5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA. Hybridisierungsproben waren a. ^{32}P-BTYP-2 und b. ^{32}P- LEU2 SalI/EcoRI-Fragment aus pKB4101.

coil-Bande, die größer als die von pMP78 ist.
Das Plasmid 2-µmleu2 ist in wenigen Kopien in der DNA von allen AH22(pMP78) Transformanten neben der 2-µm DNA und pMP78 vorhanden. Es ist nach HindIII-Verdauung der DNA zu erkennen am Auftreten der HindIII-1-leu2 Bande (Abb. 5 und 6). Das zweite HindIII-leu2 Fragment des Plasmids 2-µmleu2 kommt auch in pMP78 vor.
Zum Nachweis, daß die HindIII-Banden 1-leu2 und 3-leu2 tatsächlich LEU2 Sequenzen enthalten, wurde DNA aus mehreren AH22(pMP78) Kolonien nach HindIII-Verdauung mit dem radioaktiv markierten LEU2 SalI/EcoRI-Fragment aus pKB4101 hybridisiert (Abb. 6b) und parallel mit BTYP-2 als pBR325/ 2-µm DNA-Probe (Abb. 6a). Die 1-leu2 Bande hybridisiert nur schwach mit dem LEU2 Fragment, da sie nur in dem Plasmid 2-µmleu2 vorkommt, das in wenigen Kopien in den AH22(pMP78) Transformanten vorliegt (Abb. 6b). Die 3-leu2 Bande hingegen hybridisiert stark, da sie außer in 2-µmleu2 auch in pMP78 vertreten ist. Die chromosomale LEU2 Bande, die in nur einer Kopie pro Zelle vorliegt, ist erst nach langer Expositionsdauer auf dem Autoradiogramm zu erkennen und daher in Abb. 6b nicht sichtbar.

3.2. Verlust endogener 2-µm DNA

Bisher gab es keine Möglichkeit, endogene 2-µm DNA aus der Zelle zu eliminieren. Methoden, die zur Entfernung bakterieller Plasmide oder mitochondrialer in Hefe angewandt werden, haben keinen Effekt auf die endogene 2-µm DNA (Clark-Walker 1972, Griffiths et al. 1975, Toh-E und Wickner 1981). Möglicherweise liegt dies an der Chromatinstruktur und Lokalisierung der 2-µm DNA im Zellkern. Cir^{o} Stämme sind gute Wirtsstämme für 2-µm DNA-Vektoren, da die Plasmide nicht durch Rekombination mit endogenen 2-µm DNA-Molekülen verändert werden können. Weiterhin tritt keine Segregation als Folge der Inkompatibilität zwischen endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen auf, und bestimmte Plasmide sind daher im cir^{o} Stamm stabiler als im isogenen CIR^{+} Stamm (vergl. 3.1.4.).
Wie schon in Kapitel 3.1.3.4. kurz beschrieben wurde, kommt es nach Transformation mit bestimmten Rekombinantplasmiden häufig zum Verlust endogener 2-µm DNA. In diesem Abschnitt wird untersucht, wodurch dieses Phänomen verursacht wird und wie hoch die spontane Verlustrate in nichttransformierten Hefezellen ist.

3.2.1. 2-µm DNA-Gehalt in AH22 und YNN27

Zunächst wurde die Anzahl an endogenen 2-µm DNA-Molekülen pro Zelle bei zwei Wirtsstämmen verglichen. Es sollte untersucht werden, ob verschiedene Kolonien eines Stammes die gleiche Menge an 2-µm DNA enthalten, oder ob die Kopienzahl der 2-µm DNA variiert. Außerdem wurde die genaue Anzahl an 2-µm DNA-Molekülen im nichttransformierten Wirtsstamm AH22 bestimmt, um sie später mit der Anzahl an endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen in den Transformanten vergleichen zu können.
Aus je 7 Kolonien der Hefestämme AH22 und YNN27 wurde nach Anzucht auf Vollmedium DNA isoliert und nach HindIII-Verdauung mit einer DNA-Probe, die die gesamte 2-µm DNA und das leu2-d

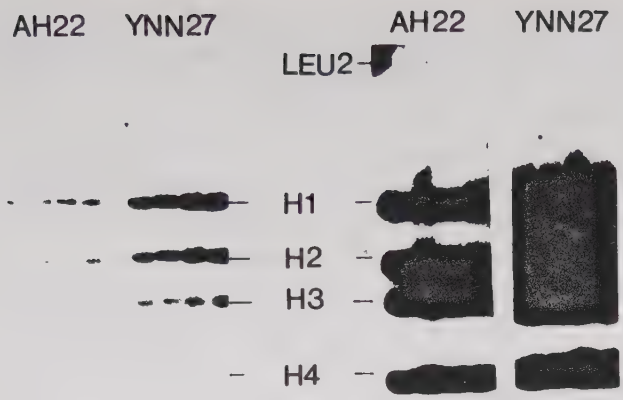


Abb. 7 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus je 4 typischen AH22 und YNN27 Kolonien. Hybridisierung mit ^{32}P-pL623, H1-H4: HindIII-Banden der 2-µm DNA, LEU2: chromosomale HindIII-Bande mit dem LEU2 Gen.
7a (links) schwach, 7b (rechts) lange exponiert.

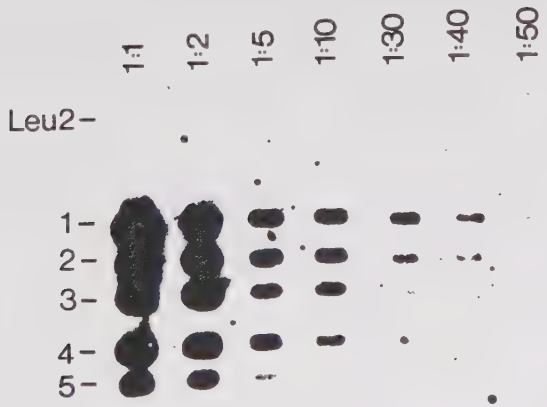


Abb. 8 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus AH22, aufgetragen in verschiedenen Verdünnungen. Hybridisierung mit ^{32}P-pL623, H1-H5: HindIII-Banden der 2-µm DNA, LEU2: chromosomale HindIII-Bande mit dem LEU2 Gen.

DNA-Fragment enthielt, im Southern-Verfahren hybridisiert. Diese DNA-Probe (pL623 DNA) hybridisiert mit allen 2-µm DNA-Sequenzen im gleichen Maße und außerdem mit dem chromosomalen LEU2 Gen, das zur internen Eichung eingesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigten, daß alle untersuchten Kolonien eines Stammes etwa die gleiche Menge an 2-µm DNA-Molekülen enthielten. In Abb. 7 ist der DNA-Gehalt von 4 typischen AH22 und YNN27 Kolonien dargestellt. Aus Abb. 7 kann man ersehen, daß die Intensität der 2-µm DNA-Banden, verglichen mit der chromosomalen LEU2 Bande, die in einer Kopie pro haploidem Genom vorliegt, für die einzelnen Kolonien eines Stammes etwa gleich ist. YNN27 Zellen enthalten offensichtlich wesentlich mehr 2-µm DNA-Moleküle als AH22 Zellen. Die Intensität der H3-Bande von YNN27 in Pos. 1, Abb. 7a entspricht etwa der der H1-Bande von AH22 in Pos. 2, Abb. 7a. Die H1-Bande der 2-µm DNA ist 4,1 kb, die H3-Bande 2,2 kb groß. Da die Intensität der H1-Bande der 2-µm DNA in AH22 der Intensität der H3-Bande in YNN27 vergleichbar ist, kann man ableiten, daß YNN27 etwa doppelt soviele 2-µm DNa-Moleküle wie AH22 enthält.
Um die absolute Zahl an 2-µm DNA-Molekülen in AH22 zu bestimmen, wurde HindIII verdaute DNA in Verdünnungen von 1:1 bis 1:50 auf ein Gel aufgetragen und nach Southern-Transfer mit pL623 als 2-µm DNA/LEU2-Probe hybridisiert. Die Intensität der 2-µm DNA-Banden wurde verglichen mit der Intensität der chromosomalen LEU2 Bande als Standard für eine Genkopie pro haploidem Genom. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nur ein ca. 1,3 kb großes DNA-Fragment der insgesamt 10 kb großen chromosomalen LEU2 Bande mit pL623 DNA hybridisiert. Die Schwärzung der LEU2 Bande der 1:1 Verdünnung entspricht der Intensität der 1,3 kb großen H4-Bande der 2-µm DNA in der 1:40 Verdünnung (Abb. 8). Die H4-Bande der 2-µm DNA kommt in beiden Formen der 2-µm DNA vor, und man kann aus diesem Vergleich schließen, daß AH22 etwa 40 2-µm DNA-Moleküle pro haploidem Genom enthält. YNN27 enthält etwa doppelt soviel endogene 2-µm DNA (Abb. 7), also ca. 80 Moleküle pro haploidem Genom.

3.2.2. Spontaner Verlust der 2-µm DNA

Es wurde untersucht, wieviel Prozent auf Vollmedium angezogener Hefezellen endogene 2-µm DNA enthalten. Je 200 Kolonien der Stämme AH22 und YNN27 wurden durch Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierten 2-µm DNA-Sequenzen auf ihren Plasmid-Gehalt geprüft. 1 % der AH22 und 0,5 % der YNN27 Kolonien waren cir^{O}, was durch Southernhybridisierung bestätigt wurde.
Die Generationszeiten und das Wachstumsverhalten dieser spontanen cir^{O} Klone wich nicht von denen der CIR^{+} Kolonien ab. Um eventuell bestehende geringe Wachstumsunterschiede erkennen zu können, wurden CIR^{+} und cir^{O} Zellen im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und zusammen über 700 Generationen auf Vollmedium angezogen. Nach je 100 Generationen wurden Zellen ausplattiert und durch Koloniehybridisierung auf ihren 2-µm DNA-Gehalt untersucht. Es wurde keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von CIR^{+} zu cir^{O} Zellen festgestellt. Daraus kann man folgern, daß 2-µm DNA keinen Einfluß auf das Wachstum von Hefe auf Vollmedium ausübt.

3.2.3. Verlust endogener 2-µm DNA nach Transformation

Wie bei der Stabilitätsbestimmung bereits kurz angesprochen wurde, kam es nach Transformation von CIR^{+} Stämmen mit Plasmiden, die das leu2-d Allel als selektiven Marker trugen, häufig zum Auftreten von cir^{O} Kolonien. Zellen, die das Rekombinantplasmid verloren hatten, enthielten auch keine endogene 2-µm DNA mehr.
In diesem Abschnitt wird untersucht, wie häufig und unter welchen Bedingungen es nach Transformation mit leu2-d Plasmiden zur Entstehung von cir^{O} Zellen kommt, und ob Plasmide mit anderen Markern den gleichen Effekt erzielen können.

3.2.3.1. 2-µm DNA-Verlust nach Transformation mit leu2-d Plasmiden

Bei der Stabilitätsbestimmung von Transformanten mit leu2-d Plasmiden wurde beobachtet, daß Zellen (Phänotyp leu^- bla^-), die das Rekombinantplasmid verloren hatten, im Koloniehybridisierungsexperiment nicht mehr mit 2-µm DNA-Sequenzen hybridisierten. Um die Ergebnisse der Koloniehybridisierung zu bestätigen und genaue Kenntnis über die Anordnung von Plasmid-DNA-Sequenzen in der Zelle zu bekommen, wurde DNA aus verschiedenen Transformanten isoliert und nach der Methode von Southern analysiert. In Abb. 9, B und D ist die DNA zweier leu^- bla^- cir^o AH22(pMP78) Kolonien sowie zum Vergleich DNA aus zwei AH22(pMP78) Transformanten mit dem Phänotyp Leu^+

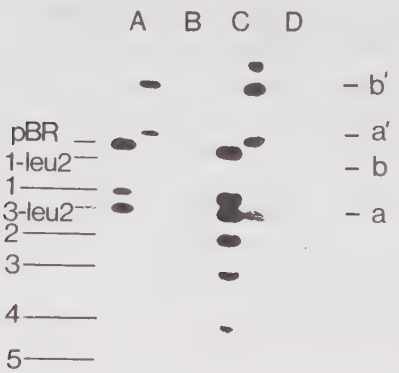


Abb. 9 Autoradiogramm unverdauter (rechts) und HindIII verdauter DNA (links) aus 4 AH22(pMP78) Kolonien nach Wachstum auf Vollmedium. Hybridisierung mit ^{32}P-BTYP-2 DNA. 1-5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA, pBR und 3-leu2 sind die HindIII-Banden von pMP78, 1-leu2 entsteht durch Rekombination zwischen 2-µm DNA und pMP78, a,a´ und b,b´sind die supercoiled und relaxierten Formen der 2-µm DNA und von pMP78.

Bla^+ CIR^+ aufgetragen (Abb. 9, A und C). Keine Bande der DNA aus den zwei leu^- bla^- cir^o AH22(pMP78) Kolonien hybridisiert mit der 2-µm DNA/pBR325-Probe (BTYP-2 DNA), was die Ergebnisse der Koloniehybridisierung bestätigt. Die Bedingungen im Southern-Hybridisierungsexperiment waren so gewählt, daß auch DNA-Sequenzen, die in nur einer Kopie pro haploidem Genom vorkommen, nachgewiesen werden konnten (Saunders et al. 1979). Die leu^- bla^- cir^o Kolonien, deren DNA in Abb. 9 dargestellt ist, haben also demnach alle Plasmid-DNA-Sequenzen verloren. In Abb. 9,A und C ist zum Vergleich die DNA aus zwei AH22(pMP78) Kolonien mit dem Phänotyp Leu^+ Bla^+ CIR^+ aufgetragen. Diese Transformanten enthalten pMP78 und 2-µm DNA. Wie das Bandenmuster mit den unverdauten DNA-Proben zeigt, liegen pMP78 und 2-µm DNA extrachromosomal vor. Die Banden a, a´und b, b´ (Abb. 9, A und C) entsprechen den supercoiled und relaxierten Formen von 2-µm DNA und pMP78. Die höhermolekularen Banden repräsentieren wahrscheinlich oligomere Formen der 2-µm DNA.

Der 2-µm DNA-Verlust nach Transformation mit leu2-d Plasmiden wurde für pMP78 Transformanten eingehend untersucht. Nach 50 Generationen Wachstum auf Vollmedium hatten 80 % der AH22(pMP78) Transformanten alle Plasmidmoleküle verloren, die übrigen 20 % enthielten endogene 2-µm DNA und pMP78. Ähnliche Ergebnisse wie für pMP78 wurden für verwandte Plasmide mit dem leu2-d Allel wie pMP80 und pMP81 ermittelt.

Der zeitliche Verlauf des 2-µm DNA-Verlustes wurde an zwei GRF18(pMP78) Transformanten untersucht (Tab. 5). GRF18 und AH22 sind isogene Stämme. Nach 15 Generationen Wachstum auf

Tab. 5 Zunahme an cir^o Zellen in Kulturen von zwei GRF18 (pMP78) Transformanten

Wachstumsbedingungen	cir^o $pMP78^o$ Zellen (in %)
15 Generationen YNBH	10
36 " YEPD	75
72 " YEPD	90

Minimalmedium YNBH hatten bereits 10 % der Zellen alle Plasmidmoleküle verloren. Nach Überführung der Zellen auf Vollmedium YEPD nahm der Anteil an cir^{o} $pMP78^{o}$ Zellen stetig zu. Nach 72 Generationen Wachstum auf Vollmedium hatten 90 % der Zellen alle Plasmidmoleküle verloren.
Für die Segregation der Rekombinantplasmide mit dem leu2-d Allel in CIR^{+} Stämmen ist typisch, daß nach Verlust der Rekombinantplasmidmoleküle nur cir^{o} Zellen gefunden wurden. Da nach Verlust von pMP78 nur cir^{o} und keine CIR^{+} Zellen gefunden wurden, muß man annehmen, daß 2-µm DNA zuerst verlorengeht, gefolgt vom pMP78 Verlust. Da pMP78 allein unter nichtselektiven Bedingungen nicht stabil repliziert werden kann, sind Zellen, die nur pMP78 enthalten, selten und daher schwierig zu finden.
Der 2-µm DNA-Verlust in AH22(pMP78) Zellen tritt schon direkt nach der Transformation auf. Aus 16 AH22(pMP78) Kolonien, die direkt von der Transformationsplatte in Minimalmedium übergeimpft wurden, wurde der Plasmid-DNA-Gehalt untersucht (Abb. 10). Alle Kolonien enthalten viele pMP78

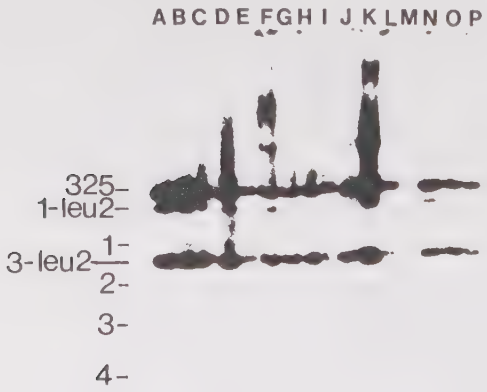


Abb. 10 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus verschiedenen AH22(pMP78) Transformanten nach selektiver Anzucht direkt nach der Transformation. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-BTYP-2 DNA (enthält pBR322 und 2-µm DNA). H1-H4: HindIII-Banden der 2-µm DNA, H5 ist nicht zu sehen. pBR325 und H3-leu2 sind die HindIII-Banden von pMP78.

Moleküle, zu erkennen an der intensiven pBR325 und H3-leu2 Bande. Die Menge an endogener 2-µm DNA ist stark reduziert. Die Transformanten I und M (Abb. 10) enthalten nur pMP78 und sind cir^{o}. Dieses Ergebnis zeigt, daß die 2-µm DNA vor dem Rekombinantplasmid bereits während des selektiven Wachstums verlorengeht. Ein Teil der ursprünglichen Transformantenkolonien besitzt also nur pMP78 Moleküle und cir^{o}. Wie schon vorher erwähnt, ist das Plasmid pMP78 in einer cir^{o} Zelle sehr instabil, da hier die REP Genprodukte der 2-µm DNA, die für die stabile Replikation benötigt werden, fehlen.
Der Verlust der 2-µm DNA vor dem Rekombinantplasmid konnte bei AH22(pJDB219) Transformanten nachgewiesen werden. Das Plasmid pJDB219 enthält das leu2-d Allel und die gesamte 2-µm DNA (Abb. 3) und ist deshalb auch im cir^{o} Stamm relativ stabil. Kolonien, die nur dieses Rekombinantplasmid und keine 2-µm DNA mehr enthielten, wurden nach Transformation von AH22 mit pJDB219 gefunden. Aus 8 verschiedenen AH22(pJDB219) Kolonien, die nach 60 Generationen selektiven und anschliessend 60 Generationen nichtselektiven Wachstums noch Leu^{+} waren, wurde DNA isoliert. Alle 8 Transformanten enthielten nur pJDB219 und keine endogene 2-µm DNA mehr.
Die Tatsache, daß von AH22(pMP78) und AH22(pJDB219) Transformanten Abkömmlinge gefunden wurden, die nur Rekombinantplasmidmoleküle und keine 2-µm DNA mehr enthielten, zeigt deutlich, daß zuerst die natürliche 2-µm DNA verlorengeht und anscheinend durch die leu2-d Plasmide aus der Zelle verdrängt wird.

3.2.3.2. 2-µm DNA nichtkurierende Plasmide

Es wurde untersucht, wie häufig 2-µm DNA-Verlust in CIR^{+} Stämmen nach Transformation mit Plasmiden auftritt, die andere LEU2 Allele als das leu2-d Allel oder andere selektive Markergene wie das HIS3 oder TRP1 Gen tragen.
Die Plasmide wurden durch Markergen-Analyse und Hybridisierung mit einer pBR325/2-µm DNA-Probe nachgewiesen. Für Zellen,

Tab. 6 Anzahl an CIR^+ und cir^o Kolonien (in %) in verschiedenen Hefetransformanten nach 50 Generationen Wachstum auf Vollmedium. Es wurden je 130-250 Kolonien untersucht. Rek.=Rekombinantplasmid.

CIR^+ Stamm	Plasmid	selektiver Marker	cir^o Rek.^{o}	CIR^+ Rek.^{o}	CIR^+ Rek.$^+$
AH22	pMP78	leu2-d	80	0	20
AH22	pDB248	LEU2/pJDB248	5	78	17
AH22	pHKB52	LEU2/pYe10	1	69	30
GRF18	YEp6	HIS3	0	100	0
YNN27	pMA56	TRP1	1	70	29

die Rekombinantplasmide enthielten, konnte mit Hilfe der Hybridisierungsmethoden nicht ausgesagt werden, ob noch endogene 2-µm DNA präsent war, denn sowohl die Rekombinantplasmide als auch 2-µm DNA hybridisieren mit der pBR325/2-µm DNA-Probe. Da aber die hier zu testenden Plasmide, mit Ausnahme von pHKB 52, unter nichtselektiven Bedingungen ohne endogene 2-µm DNA innerhalb weniger Generationen verlorengehen, kann man annehmen, daß die Kolonien, die das Rekombinantplasmid noch besassen, stets auch endogene 2-µm DNA enthielten. Die Plasmid-DNA-Zusammensetzung in AH22(pHKB52) Transformanten wurde nach der Methode von Southern analysiert.

Aus Tab. 6 kann man ersehen, wie hoch der Anteil an cir^o Zellen nach Transformation von CIR^+ Stämmen mit Plasmiden ist, die verschiedene selektive Marker tragen. Nur das Plasmid pMP78 mit dem leu2-d Allel bewirkt effektive Kurierung der 2-µm DNA. Transformanten, die die Plasmide pDB248 und pHKB52 mit anderen LEU2 Allelen enthalten, waren hingegen nach Verlust des Rekombinantplasmids fast immer CIR^+ (Tab. 6). Der Anteil an cir^o Zellen bei AH22(pDB248) und AH22(pHKB52) Transformanten entspricht in etwa der spontanen 2-µm DNA-Verlustrate von 1 % im nichttransformierten Stamm AH22.

Auch Plasmide mit dem HIS3 Gen oder dem TRP1 Gen als selektivem Marker wie YEp6 und pMA56 bewirken keine Verdrängung der 2-µm DNA (Tab. 6). Nach Verlust von YEp6 und pMA56 enthielten

die meisten Zellen noch endogene 2-µm DNA.
Die Ergebnisse in Tab. 6 zeigen deutlich, daß es zur Kurierung der 2-µm DNA nur nach Transformation mit Plasmiden, die das leu2-d Allel als selektiven Marker tragen, kommt.

3.2.3.3. Einfluß der Plasmidkopienzahlen auf den 2-um DNA-Verlust

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Instabilität von 2-µm DNA-Vektoren in Hefe auf Inkompatibilität zwischen endogener 2-µm DNA und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen zurückzuführen ist, wurde die Kopienzahl der 2-µm DNA-Plasmide in verschiedenen Hefetransformanten untersucht.
Rekombinantplasmide, die in höherer Kopienzahl als 2-µm DNA in der Zelle vorkommen, sollten endogene 2-µm DNA-Moleküle aus der Zelle verdrängen, während solche, die in wenigen Kopien pro Zelle vorliegen, dies nicht können, sondern selbst von der 2-µm DNA verdrängt werden. Unter Bedingungen, die selektiv für Gene auf dem Rekombinantplasmid sind, können nur Zellen wachsen, die mindestens eine Kopie des Rekombinantmoleküls enthalten.
Zur Untersuchung der Plasmidkopienzahlen wurde DNA aus Transformanten isoliert, die direkt von den Transformationsplatten abgeimpft und dann selektiv angezogen worden waren. Die DNA wurde nach der Methode von Southern analysiert. Als Hybridisierungsprobe diente das Plasmid pL623, das die gesamte 2-µm DNA, leu2-d und pBR325 enthält, und mit nahezu allen DNA-Sequenzen der hier untersuchten Plasmide im gleichen Maße hybridisiert.
In Abb. 11 wird jeweils der Plasmidgehalt zweier Transformanten miteinander verglichen, deren Rekombinantplasmide ähnliche 2-µm DNA-Sequenzen, aber verschiedene selektive Marker tragen und sich im Kurieren der 2-µm DNA unterscheiden. In Abb. 11a wird die Plasmid-DNA von AH22 Zellen nach Transformation mit pMP78 und pDB248 verglichen, in Abb. 11b AH22 (pJDB219) und AH22(pHKB52) Transformanten, in Abb. 11c GRF18 transformiert mit pMP78 und YEp6. Aus Abb. 11a-c ist deutlich zu ersehen, daß pMP78 und pJDB219, die Plasmide mit dem

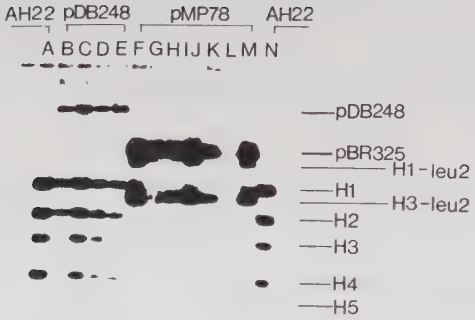
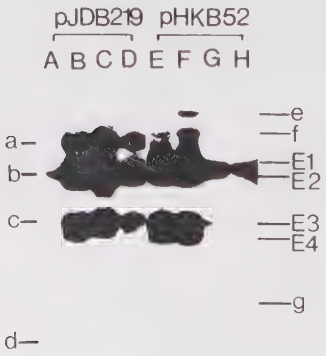


Abb. 11 Autoradiogramme der Plasmid-DNA aus verschiedenen Transformanten nach selektiver Anzucht. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-pL623 DNA.
11a (oben). HindIII verdaute DNA aus A,N: AH22, B-E: AH22(pDB248), F-M: AH22(pMP78). H1-H5 sind die HindIII-Fragmente der 2-µm DNA.
11b (unten). EcoRI verdaute DNA aus A-D: AH22(pJDB 219), E-H: AH22(pHKB52). E1-E4 sind die EcoRI-Banden der 2-µm DNA, a-d: pJDB219 Banden, e-g: pHKB52 Banden, pJDB219 und pHKB52 enthalten außerdem wie die endogene 2-µm DNA die E1- und E3-Bande.



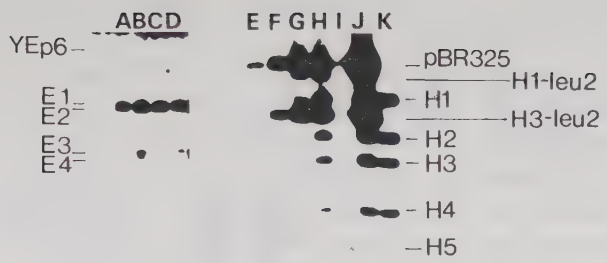


Abb. 11c Autoradiogramme mit der Plasmid-DNA aus verschiedenen Transformanten nach selektiver Anzucht. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-pL623 DNA. A-D: EcoRI verdaute DNA aus GRF18(YEp6), E-J: HindIII verdaute DNA aus GRF18 (pMP78), K: HindIII verdaute DNA aus AH22. H1-H5 sind die HindIII- und E1-E4 die EcoRI-Banden der endogenen 2-µm DNA.

leu2-d Allel, in höherer Kopienzahl vorliegen als die endogene 2-µm DNA. Die Rekombinantplasmide pDB248, pHKB52 und YEp6, die andere LEU2 Allele als leu2-d oder das HIS3 Gen als selektiven Marker tragen, liegen hingegen jeweils in weniger Kopien als die endogene 2-µm DNA vor.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß für die Kopienzahl der 2-µm DNA-Vektoren in CIR$^+$ Stämmen offensichtlich die Wahl des selektiven Markers entscheidend ist. Die 2-µm DNA-Sequenzen scheinen keinen Einfluß auf die Kopienzahl zu haben. Die leu2-d Plasmide pJDB219 mit gesamter 2-µm DNA und pMP78 mit einem 2-µm DNA-Fragment liegen in größerer Anzahl vor als endogene 2-µm DNA, während pHKB52, das die gesamte 2-µm DNA enthält, und pDB248, das nur ein EcoRI-Fragment der 2-µm DNA trägt, mit anderen LEU2 Allelen als selektiven Markern in niedrigerer Kopienzahl als die endogene 2-µm DNA vorkommen.

Zur genaueren Kopienzahlbestimmung der leu2-d Plasmide wurde DNA aus AH22(pMP78) Transformanten isoliert und nach Verdauung mit HindIII in Verdünnungen von 1:1 bis 1:50 auf einem Gel aufgetrennt und mit einer radioaktiv markierten Probe (pL623 DNA), die 2-µm DNA, pBR325 und leu2-d enthält, und da-

her mit allen 2-µm DNA und pMP78 Sequenzen etwa gleich stark hybridisiert.
In Abb. 12a ist die DNA aus einem typischen AH22(pMP78) Transformanten aufgetragen. Die Intensität der H2-Bande der endogenen 2-µm DNA in der 1:2 Verdünnung entspricht etwa der Intensität der H3-leu2-Bande von pMP78 in der 1:30 Verdünnung. Da das H2-Fragment der 2-µm DNA nur in ungefähr der Hälfte aller 2-µm DNA-Moleküle vorkommt, nämlich nur in Typ 14, kann man sagen, daß AH22(pMP78) Transformanten etwa 7mal mehr pMP78 als 2-µm DNA-Moleküle enthalten. Um die absolute Zahl der Plasmidmoleküle zu ermitteln, wurde die Intensität der Plasmidbanden mit der Intensität der chromosomalen LEU2 Bande als internem Marker verglichen. Die chromosomale LEU2 Bande, die in einer Kopie pro Zelle vorliegt, in der 1:2 Verdünnung ist etwa gleich stark wie die pBR325 Bande von pMP78 in der 1:50 Verdünnung. AH22(pMP78) Transformanten enthalten demnach ca. 25 pMP78 Moleküle und 4 2-µm DNA-Moleküle (Abb. 12a).
Die Kopienzahl der 2-µm DNA-Plasmide in AH22(pMP78) Transformanten wurde verglichen mit der Anzahl an Plasmidmolekülen in AH22(pDB248) Transformanten. Im Gegensatz zum leu2-d Plasmid pMP78 liegt pDB248 in niedriger Kopienzahl vor. Abb. 12b zeigt ein Autoradiogramm mit EcoRI verdauter Plasmid-DNA aus einem typischen AH22(pDB248) Transformanten. Die Intensität der pDB248 Doppelbande a+b ist vergleichbar mit der Intensität der E1- oder E2-Bande der endogenen 2-µm DNA in der gleichen Verdünnungsstufe. Die Menge der beiden pDB248 Banden a und b zusammen entspricht also der Menge an E1 in Typ 14 oder E2 in Typ 23 der 2-µm DNA. Da die zwei Formen der 2-µm DNA in äquimolaren Mengen vorliegen, enthalten AH22(pDB248) Zellen demnach etwa 4mal mehr endogene 2-µm DNA- als pDB248 Moleküle. Die absolute Anzahl an Plasmidmolekülen kann man aus Abb. 12b nicht ersehen, da die zwei chromosomalen EcoRI-Banden mit LEU2 Sequenzen, die als interne Marker dienen sollten, auf Grund der kurzen homologen DNA-Sequenz von ca. 0,6 kb nur sehr schwach mit der radioaktiven Probe hybridisierten und auch nach langer Exposition des Filters nicht zu sehen waren. Es wurde deshalb die Intensität aller Plasmidbanden zusammen

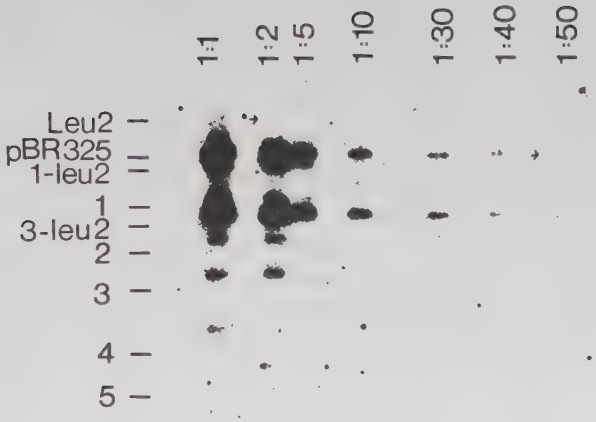


Abb. 12 Autoradiogramme zur Kopienzahlbestimmung von endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen in verschiedenen Hefetransformanten, Hybridisierung mit ^{32}P-pL623 DNA.
12a (oben): HindIII verdaute DNA aus AH22(pMP78), H1-H5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA.
12b (unten): EcoRI verdaute DNA aus AH22(pDB248), E1-E4 sind die EcoRI-Banden der 2-µm DNA, a-c die pDB248-Banden.

in AH22(pDB248) Transformanten und im Wirtsstamm AH22, der etwa 40 2-µm DNA-Moleküle enthält, verglichen, nachdem gleiche DNA-Mengen aufs Gel aufgetragen wurden. Die Intensität der 2-µm DNA-Banden von AH22 entsprach der von 2-µm DNA und pDB248 zusammen in AH22(pDB248) Zellen (vergl. Abb. 11). AH22(pDB248) Transformanten enthalten also insgesamt ca. 40 Plasmidmoleküle und 4mal mehr endogene 2-µm DNA als pDB248 Moleküle, d. h. in absoluten Zahlen ausgedrückt, etwa 32 2-µm DNA und 8 pDB248 Moleküle.
Aus den Untersuchungen zur Bestimmung der Plasmidkopienzahlen kann man schließen, daß die Instabilität von 2-µm DNA-Plasmiden zumindest zu einem Teil auf die Inkompatibilität zwischen endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen zurückgeführt werden kann. Das Plasmid, das in der höchsten Kopienzahl vorliegt, kompetiert das andere bei der DNA-Replikation und/oder Transmission aus der Zelle heraus. Dieses Phänomen ist vergleichbar mit der Inkompatibilität bei bakteriellen Systemen.

3.2.3.4. Einfluß der Transformationsbedingungen auf den 2-µm DNA-Verlust

In den vorangegangenen Experimenten wurde gefunden, daß die Kurierung der 2-µm DNA nur durch Rekombinantplasmide mit dem leu2-d Allel als selektivem Marker verursacht wird, und daß diese Plasmide in hoher Kopienzahl in der Hefezelle vorliegen. Die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide kann zwei verschiedene Ursachen haben:
(1) Plasmide mit dem leu2-d Fragment werden bevorzugt repliziert, zum Beispiel wegen eines zusätzlichen Replikationsstartpunktes.
(2) Das leu2-d Allel wird schwach exprimiert, und die hohe Anzahl an leu2-d Kopien ist die Voraussetzung für das Wachstum ohne Leucin.
Um zu klären, ob die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide und die dadurch verursachte Verdrängung der 2-µm DNA von der Expression des leu2-d Allels beeinflußt wird, wurde eine Transformation unter nichtselektiven Bedingungen in Gegenwart von Leucin durchgeführt.

Um eine solche Transformation durchzuführen, was bisher wegen fehlender Bestimmungsmöglichkeiten nicht möglich war, wurde das Plasmid pADH040-2 verwendet (Abb. 13), das von Reipen (1982) in unserem Labor konstruiert wurde, Das Plasmid pADH040-2 enthält neben dem leu2-d Allel als zweiten Marker das bakterielle ß-Lactamase (bla) Gen unter Kontrolle des ADH1 Promotors aus Hefe. Dadurch ist die Expression des bla Gens stark erhöht. Die ß-Lactamase-Aktivität von AH22 (pADH040-2) Transformanten ist ungefähr 100mal höher als in AH22(pMP78) Transformanten und hoch genug, um Transformantenkolonien direkt auf ß-Lactamase-Indikatorplatten zu entdecken. Auch nichtselektiv gewachsene Transformantenkolonien, die pADH040-2 enthalten, können auf Grund ihrer hohen ß-Lactamase-Aktivität direkt auf Indikatorplatten entdeckt werden.

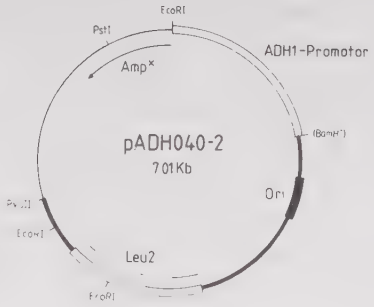


Abb. 13
Plasmid pADH040-2,
2-µm DNA (breite Linien),
pBR322 (dünne Linien),
Amp*: Ampicillinresistenzgen ohne bakteriellen Promotor.

Der Hefestamm AH22 wurde mit pADH040-2 unter selektiven und nichtselektiven Bedingungen transformiert und zunächst wurde die Stabilität der isolierten Transformanten durch Bestimmung des Phänotyps ermittelt. Für selektiv isolierte AH22(pADH040-2) Transformanten wurde ein Verlust von 1,5 % an transformierten Zellen pro Generation gefunden, für nichtselektiv isolierte Transformanten ein Verlust von 1,2 %. Die Stabilität von AH22(pADH040-2) Transformanten, die unterschiedlich isoliert wurden, ist ungefähr gleich und vergleichbar mit der Stabilität von pMP78 in AH22 (siehe 3.1.3.). Die beiden Plasmide

pADH040-2 und pMP78 enthalten das leu2-d Allel und die 2-µm DNA-Replikationsstartstelle; beiden Molekülen fehlen die REP Gene der 2-µm DNA.

Die Stabilität der AH22(pADH040-2) Transformanten nach selektiver und nichtselektiver Transformation war zwar etwa gleich, es zeigten sich aber große Unterschiede in der Plasmidzusammensetzung der Transformanten.

Jeweils 200 Kolonien selektiv und nichtselektiv isolierter AH22(pADH040-2) Zellen wurden nach Wachstum auf Vollmedium durch Koloniehybdridisierung auf ihren Gehalt an endogener 2-µm DNA untersucht. Das Ergebnis war eindeutig (Abb. 14). Nur in selektiv transformierten AH22(pADH040-2) Kolonien kam es zur Bildung von cir^{o} Zellen (Abb. 14B), die dann auch keine pADH040-2 Moleküle enthielten. Die cir^{o} pADH040-2^{o} Kolonien hybridisierten nicht mehr mit der 2-µm DNA-Probe und sind auf dem Autoradiogramm (Abb. 14B) nicht sichtbar. Die Kolonien nichtselektiv isolierter AH22(pADH040-2) Transformanten, die nach Wachstum auf Vollmedium das Rekombinantplasmid verloren hatten, enthielten noch die endogene 2-µm DNA. Sie hybridisierten mit der radioaktiv markierten 2-µm DNA-Probe und sind in Abb. 14A als schwarze Flecken auf dem Autoradiogramm zu erkennen.

Die Ergebnisse der Koloniehybridisierung wurden durch DNA-Analyse auf Southern-Filtern bestätigt und sind in Abb. 15

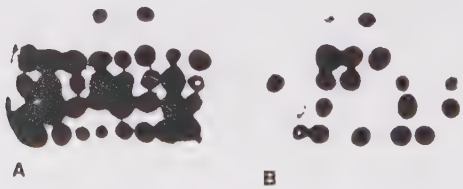


Abb. 14 Autoradiogramm einer Koloniehybridisierung von AH22 (pADH040-2) Transformanten nach Wachstum auf Vollmedium. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-BTYP-2 DNA. 2 Kolonien von AH22 (positive Kontrolle) oben und von YT6-2-1L (negative Kontrolle) unten auf den Filtern. A: 32 nichtselektiv isolierte Transformantenkolonien, B: 32 selektiv isolierte Transformantenkolonien, 15 davon sind leu^{-} bla^{-} cir^{o}.

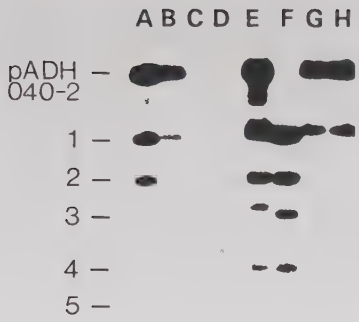


Abb. 15 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus AH22 (pADH040-2) Transformanten nach Anzucht auf Vollmedium. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-pL623 DNA. A-D: selektiv isolierte, E-H: nichtselektiv isolierte Transformanten. 1-5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA. Die nichtgekennzeichneten Banden entstehen durch Rekombination zwischen pADH040-2 und 2-µm DNA.

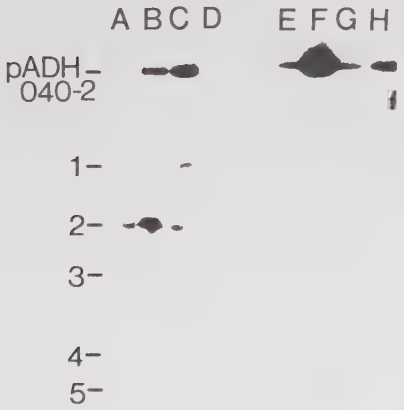


Abb. 16 Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus AH22 (pADH040-2) Transformanten. Hybridisierungsprobe: ^{32}P-pL623 DNA. A-D: nichtselektiv isolierte Transformanten, angezogen auf Vollmedium; E-H: selektiv isolierte Transformanten, angezogen auf Selektivmedium. 1-5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA.

dargestellt. In den Positionen A-D ist DNA aus selektiv isolierten und in den Positionen E-H ist DNA aus nichtselektiv isolierten Transformantenkolonien aufgetragen. C und D (Abb. 15) waren leu^- bla^- Kolonien; sie sind cir^o und haben alle Plasmidsequenzen verloren. Die leu^- bla^- Kolonie F, die von einem nichtselektiv isolierten Transformanten abstammt, ist im Gegensatz zu C und D (Abb. 15) CIR^+ und enthält noch endogene 2-µm DNA. Die Leu^+ Bla^+ Kolonien selektiv (A, B in Abb. 15) und nichtselektiv (E, G, H in Abb. 15) isolierter AH22(pADH040-2) Transformanten zeigen den gleichen Genotyp; sie enthalten alle endogene 2-µm DNA und pADH040-2.

Aus den hier beschriebenen Versuchsergebnissen geht deutlich hervor, daß es zum Verlust endogener 2-µm DNA nur nach selektiver Transformation von AH22 mit pADH040-2 kommt.

Der Verlust der 2-µm DNA-Moleküle erfolgt direkt nach der Transformation während des Wachstums auf Minimalmedium ähnlich wie bei AH22(pMP78) Transformanten. Das zeigen die Ergebnisse, die in Abb. 16 dargestellt sind. In Abb. 16 werden die Kopienzahlen der Plasmide pADH040-2 und 2-µm DNA in selektiv und nichtselektiv isolierten Transformanten verglichen. Dazu wurde DNA aus auf Vollmedium gewachsenen, nichtselektiv transformierten Kolonien und aus auf Minimalmedium angezogenen, selektiv isolierten Transformanten nach HindIII-Verdauung auf Southern-Filtern analysiert. Abb. 16 zeigt, daß in nichtselektiv isolierten Transformanten (A-D) mehr 2-µm DNA-Moleküle vorliegen als in selektiv isolierten Transformanten (E-H). Umgekehrt verhält es sich mit der Menge an pADH040-2 Molekülen. So zeigt insbesondere Transformant F in Abb. 16 eine starke pADH040-2 Bande, die Menge an 2-µm DNA ist stark reduziert.

Bei der Untersuchung des Plasmidgehaltes in nichtselektiv isolierten AH22(pADH040-2) Transformanten muß man berücksichtigen, daß möglicherweise nur ein Teil der Zellen in einer Kolonie mit hoher ß-Lactamase-Aktivität tatsächlich das Plasmid pADH040-2 enthält. Der Anteil an Leu^+ Bla^+

Zellen in nichtselektiv isolierten AH22(pADH040-2) Kolonien variierte zwischen 20 % und 90 %. Zur Untersuchung der Plasmidzusammensetzung in Abb. 16 wurden Kolonien gewählt, die 70-80 % Leu^+ Bla^+ Zellen enthielten.
Die Tatsache, daß nur Wachstumsbedingungen, die selektiv für das leu2-d Allel sind, zu einer hohen Kopienzahl der leu2-d Plasmide führen, schließt eine höhere Replikationsrate als Grund für die hohe Kopienzahl dieser Plasmide aus, da diese Eigenschaft auch unter selektiven Bedingungen auftreten sollte.

3.2.3.5. Rekombinantplasmide mit dem leu2-d Allel, die keinen 2-µm DNA-Verlust bewirken

In diesem Abschnitt wird gezeigt, daß es zum 2-µm DNA-Verlust nur dann kommt, wenn leu2-d Plasmide in hoher Kopienzahl vorliegen. Wird die Kopienzahl solcher Plasmide herabgesetzt, bleibt endogene 2-µm DNA in der Zelle erhalten. Durch Insertion bestimmter DNA-Fragmente wurden zwei leu2-d Plasmide so verändert, daß ihre Kopienzahl reduziert war, und endogene 2-µm DNA nicht aus der Zelle verdrängt wurde.
(1) Insertion eines zusätzlichen LEU2 Allels
In das Plasmid pMP80 (Abb. 3), das 2-µm DNA-Verlust bewirkt, wurde das 2-µm DNA nichtkurierende LEU2 Allel aus pYe10 integriert. Das Plasmid pMP80 wurde anstelle von pMP78 gewählt, weil das Tetrazyklin-Resistenzgen auf pMP80 intakt ist und daher als Marker bei der Plasmidkonstruktion verwendet werden konnte. Dieses pL72 genannte Plasmid ist in Abb. 17 dargestellt.

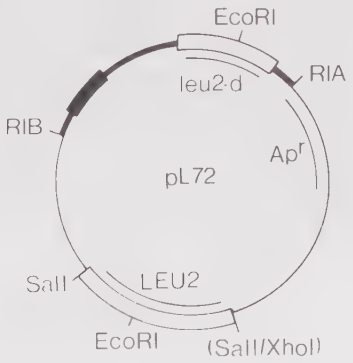


Abb. 17 Plasmid pL72, 2-µm DNA (breite Linien), pBR325 (dünne Linien).

Ein erster Effekt des zusätzlichen LEU2 Allels auf pL72 wurde bereits beim Wachstum der Transformantenkolonien sichtbar: AH22(pL72) Transformanten benötigten 3 Tage, um Kolonien auf Selektivmedium zu bilden, während Zellen mit dem Ausgangsplasmid pMP80 erst nach 4-5 Tagen zu sichtbaren Kolonien angewachsen waren.
Die Stabilität von pL72 in AH22 war mit 1,6 % Verlust an transformierten Zellen pro Generation vergleichbar mit der von pMP80. Im Gegensatz zu pMP80 wurden durch pL72 die endogenen 2-µm DNA-Moleküle nicht aus der Zelle kompetiert. Zellen, die das Plasmid pL72 verloren hatten, waren meist CIR^+.
Die Plasmid-DNA-Analyse selektiv angezogener AH22(pL72) Kolonien in Abb. 18 zeigt, daß ungefähr 30 % der gesamten Plasmid-DNA pL72 und etwa 70 % 2-µm DNA-Moleküle sind, wie man aus der Intensität der Plasmidbanden abschätzen kann. In AH22 Transformanten mit leu2-d Plasmiden wie pMP78, die 2-µm DNA-Verlust bewirken, bestand hingegen mehr als 80 % der Plasmid-DNA aus Rekombinantplasmidmolekülen (3.2.3.3.). Durch zusätzliche Insertion eines nichtkurierenden LEU2 Gens in pMP80 wurde die LEU2 Aktivität anscheinend stark erhöht, was zur schnelleren Koloniebildung auf Minimalmedium führte. Die Anwesenheit dieses zweiten LEU2 Gens führt offensichtlich zu einer verbesserten Genexpression, so daß weniger Kopien von pL72 als von pMP78 oder pMP80 zum optimalen Wachstum ausreichen. Durch die niedrige Kopienzahl

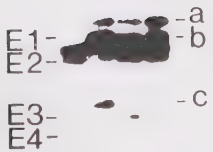


Abb. 18
Autoradiogramm EcoRI verdauter DNA aus 3 AH22(pL72) Transformanten (B-D) und AH22(A). E1-E4 sind die 2-µm DNA-Banden, a-c pL72 Banden, die kleinste pL72 Bande ist nicht zu sehen.

von pL72 kommt es nicht zur Kurierung der 2-µm DNA. Dieser Effekt zeigt noch einmal deutlich, daß die hohe Kopienzahl und der damit einhergehende 2-µm DNA-Verlust mit der Expression des leu2-d Allels in direktem Zusammenhang steht.

(2) Insertion der ARS1 Sequenz

Ein zweites Rekombinantplasmid mit intaktem leu2-d Allel, das nach selektiver Transformation des Stammes AH22 nicht die Bildung von cir^{o} Zellen verursachte, war pARS040-2 (Abb. 19). Dieses Molekül ist abgeleitet von dem 2-µm DNA kurierenden Plasmid pADH040-2 durch Einbau des TRP1/ARS1 Fragmentes aus YRp7. Das Rekombinantplasmid pARS040-2 enthält neben dem leu2-d Allel das TRP1 Gen als zweiten selektiven Marker für die Hefetransformation. Die ARS1 Sequenz enthält einen chromosomalen Replikationsstartpunkt, der autonome Replikation bewirken kann. Das Plasmid pARS040-2 enthält also im Unterschied zu pADH040-2 zwei Replikationsstartpunkte, den der 2-µm DNA und die ARS1 Sequenz.

AH22(pARS040-2) Transformanten, die nach Selektion auf Leucin isoliert und anschließend nichtselektiv auf Vollmedium angezogen wurden, verloren 1,4 % der transformierten Zellen pro Generation, was etwa dem Wert für pADH040-2 unter diesen Bedingungen entspricht. Im Gegensatz zu AH22 (pADH040-2) Zellen waren die AH22(pARS040-2) Transformanten nach Verlust des Rekombinantplasmids CIR^{+}.

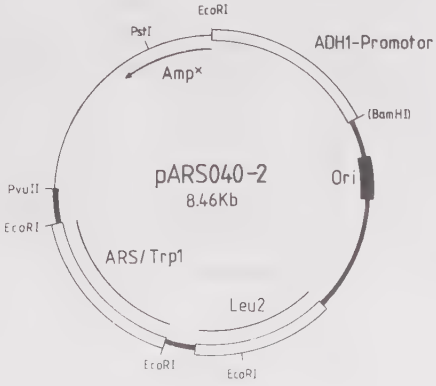


Abb. 19 Plasmid pARS040-2, 2-µm DNA (breite Linien), pBR322 (dünne Linien).

Die Plasmid-DNA-Analyse nach Southern zeigt, daß die Kopienzahl von pARS040-2 im Unterschied zum Ausgangsplasmid pADH040-2 stark herabgesetzt ist und die Zellen mehr 2-µm DNA als pARS040-2 Moleküle enthalten. Aus Abb. 20 kann man ersehen, daß in AH22(pARS040-2) Transformanten etwa 20 % der Plasmidmoleküle (ca. 8 Moleküle) pARS040-2 Moleküle sind. Die Ursache für die niedrigere Kopienzahl von pARS040-2 im Vergleich zu pADH040-2 in AH22 unter selektiven Wachstumsbedingungen hängt wahrscheinlich mit der Anwesenheit des TRP1/ARS1 Fragmentes zusammen. Möglicherweise verhindert die ARS1 Sequenz, die einen chromosomalen Replikationsstartpunkt enthält, die Amplifikation der pARS040-2 Moleküle. Es scheint, daß die Replikation von pARS040-2 bevorzugt über den ARS1 Replikationsstartbereich und nicht über den 2-µm DNA-Replikationsstartpunkt abläuft, da ARS1 möglicherweise dominant über 2-µm DNA ist. Plasmide, die nur ARS1 und nicht die Replikationsstartstelle der 2-µm DNA enthalten und eine ähnliche Länge wie YRp7 haben, liegen in niedriger Kopienzahl (weniger als 6 Moleküle) vor. Auch die Untersuchungen an AH22(pARS040-2) Transformanten haben noch einmal deutlich gezeigt, daß es zur Kurierung der 2-µm DNA nur dann kommt, wenn Rekombinantplasmide in hoher Kopienzahl vorliegen. Wird die Amplifikation der Plasmidmoleküle verhindert, wie bei pARS040-2 wahrscheinlich durch ARS1, kommt es nicht zum 2-µm DNA-Verlust.

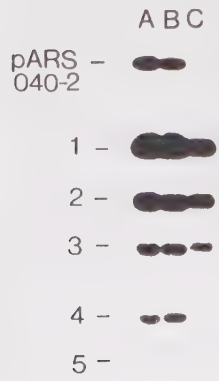


Abb. 20
Autoradiogramm HindIII verdauter DNA aus zwei AH22(pARS040-2) Transformanten (A, B) und AH22 (C). Hybridisierungsprobe war ^{32}P-pL623 DNA mit 2-µm DNA, pBR325 und leu2-d Sequenzen. 1-5 sind die HindIII-Banden der 2-µm DNA, das kleine HindIII-Fragment von pARS040-2 ist nicht zu sehen.

3.3. Vergleich zwischen dem leu2-d Allel und dem LEU2 Wildtypallel

Die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide nach Selektion der Transformanten auf Leucin, die Reduktion der Kopienzahl nach Insertion eines zweiten 2-µm DNA nichtkurierenden LEU2 Allels in ein leu2-d Plasmid, die niedrige Kopienzahl von leu2-d Plasmiden nach nichtselektiver Transformation und das langsamere Koloniewachstum von Transformanten mit leu2-d Plasmiden auf Selektivmedium führt zu der Annahme, daß das leu2-d Allel schwach exprimiert wird.
Um nachzuweisen, ob das leu2-d Allel tatsächlich schwach exprimiert wird, wurde die Enzymaktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase, dem LEU2 Genprodukt, in verschiedenen Transformanten bestimmt.
Weiterhin wurden Teile der DNA-Sequenzen des leu2-d Allels und eines LEU2 Wildtypallels miteinander verglichen, um herauszufinden, ob die schwache Expression des leu2-d Allels auf Veränderungen in der DNA-Sequenz zurückzuführen ist.

3.3.1. Regulation der ß-Isopropylmalatdehydrogenase

Leucin wird in Hefe teilweise über die gleichen Vorstufen synthetisiert wie Isoleucin und Valin (Abb. 21). Der für Leucin spezifische Syntheseweg beginnt bei der Umsetzung des 2-Ketoisovalerats, das auch Vorstufe des Valins ist, mit Acetyl-CoA zu α-Isopropylmalat. Diese Reaktion wird katalysiert durch die α-Isopropylmalatsynthase, die vom LEU4 Gen codiert wird. Der nächste Schritt ist die Umwandlung von α-Isopropylmalat zu ß-Isopropylmalat durch die α-Isopropylmalatisomerase, dem LEU1 Genprodukt. Das ß-Isopropylmalat wird unter Mitwirkung der ß-Isopropylmalatdehydrogenase, dem LEU2 Genprodukt, oxidativ decarboxyliert, wobei NADH + H^+ und CO_2 freigesetzt werden, zu 2-Ketoisocaproat, aus dem durch Transaminierung Leucin entsteht.

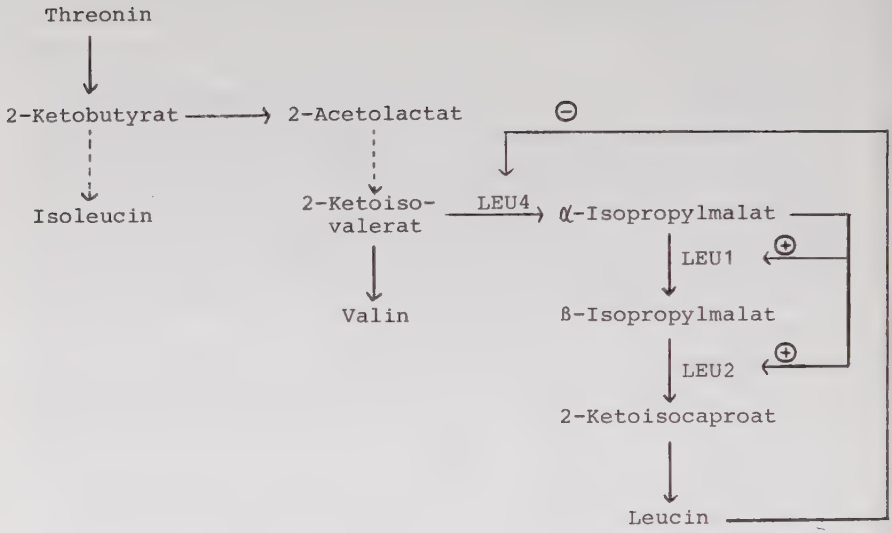


Abb. 21 Vereinfachtes Schema der Leucin-Biosynthese in Hefe

Während die α-Isopropylmalatsynthase der "allgemeinen Kontrolle" der Aminosäuresynthese unterliegt, werden die α-Isopropylmalatisomerase und die ß-Isopropylmalatdehydrogenase spezifisch reguliert und zwar zusammen (Hsu et al. 1982). In Untersuchungen von Satyanarayana et al. (1968) und Brown et al. (1975) kam es in Hefewildstämmen in Gegenwart von Leucin (1-2 mM) zum 2-3fachen Abfall der ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität. Die Zugabe von Leucin plus Threonin oder von Trypton führte zur nahezu vollständigen Hemmung der Enzymaktivität. Nach neueren Untersuchungen von Kohlhaw (1982) soll die Wirkung von Leucin oder Leucin plus Threonin eine indirekte sein: Der Grad der Repression oder Derepression der ß-Isopropylmalatdehydrogenase ist zumindest teilweise abhängig von der Menge an α-Isopropylmalat, dem ersten Produkt auf dem Leucin-Syntheseweg (Abb. 21), das von der α-Isopropylmalatsynthase gebildet wird. Da die α-Isopropylmalatsynthase der Endprodukthemmung durch Leucin unterliegt (Satyana-

rayana et al. 1968), soll die Repression der ß-Isopropylmalatdehydrogenase bei höheren Leucin-Konzentrationen auf geringe Mengen an ∝-Isopropylmalat zurückzuführen sein. Kohlhaw et al. (1980) und Hsu und Kohlhaw (1982) fanden, daß die ß-Isopropylmalatdehydrogenase in Hefetransformanten, die Plasmide mit dem LEU2 Wildtypallel aus pYe10 enthielten, genauso reguliert wurde wie im Wildstamm. Die Enzymaktivität in den Transformanten lag bis zu 30mal über der des Wildstammes, was mit der hohen Kopienzahl der Plasmide und dem damit einhergehenden Gen-Dosis-Effekt zusammenhängt. Da die Expression des LEU2 Gens auf Rekombinantplasmiden in Hefetransformanten genauso wie im Wildstamm reguliert wird und anscheinend prätranslational erfolgt (Kohlhaw et al. 1980), kann man annehmen, daß die regulatorischen DNA-Sequenzen des LEU2 Strukturgens mit auf dem Plasmid vorhanden sind.
Die spezifische Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase in verschiedenen Hefetransformanten und dem Wildstamm H1 wurde nach Anzucht auf Minimalmedium mit und ohne Leucin und auf Vollmedium bestimmt. Wie die Ergebnisse in Tab. 7 zeigen, ist die Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase nach Anzucht ohne Leucin in den untersuchten Transformanten bedeutend höher als im Wildstamm H1. Diese Aktivitätssteigerung ist auf den oben genannten Gen-Dosis-Effekt zurückzuführen. In den Transformanten liegt das LEU2 Gen in mehreren Kopien pro Zelle vor, im Wildstamm gibt es nur das chromosomale LEU2 Gen.
Die Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase in AH22(pMP78) Transformanten ist 5-7mal niedriger als in Transformanten, die die Plasmide pHKB52, pDB248 oder pL72 enthalten (Tab. 7), obwohl pMP78 nach selektivem Wachstum in höherer Kopienzahl als die letzteren drei Plasmide vorkommt. Etwa 30 pMP78 Moleküle findet man pro haploidem Genom in AH22(pMP78) Zellen. Die Enzymaktivität pro leu2-d Allel beträgt demnach ca. 0,23, das sind etwa 10 % der Wildtypaktivität von H1 (Tab. 7). Das zeigt direkt, daß das leu2-d Allel auf pMP78 defekt ist. Die LEU2 Allele auf den Plasmiden pHKB52, pDB248 und pL72 haben Wildtypaktivität; sie kommen in ca. 10-15 Kopien pro

Tab. 7 Regulation der ß-Isopropylmalatdehydrogenase in Rohextrakten verschiedener Hefestämme. Die Enzymaktivität ist in nmol NADH/min x mg Protein angegeben.

Stamm	selektiver Marker	Minimalmedium ohne Leu	Minimalmedium + 1 mM Leu	Vollmedium
AH22(pMP78)	leu2-d	7,0	1,1	0,8
AH22(pHKB52)	LEU2/pYe10	50,3	10,4	2,9
AH22(pDB248)	LEU2/pJDB248	39,8	-	0,9
AH22(pL72)	LEU2/pYe10 + leu2-d	32,0	-	1,3
H1 (Wildstamm)		2,0	1,0	0,3

Zelle vor und weisen eine 15-20mal höhere ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität als der Wildstamm H1 auf. Nach Zugabe von 1 mM Leucin ist die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität in den Transformanten und im Wildstamm stark herabgesetzt (Tab. 7). H1 besaß noch 50 %, AH22(pHKB52) 20 % und AH22(pMP78) noch etwa 15 % der ursprünglichen Aktivität. Zugabe von Leucin in der Endkonzentration von 0,17 mM (= 20µg/ml) zum Medium bewirkte noch keine Abnahme der ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität. Zur nahezu vollständigen Hemmung der ß-Isopropylmalatdehydrogenase kommt es nach Wachstum auf Vollmedium (Tab. 7). Bei der Bestimmung der Enzymaktivität in Transformanten nach nichtselektivem Wachstum auf Vollmedium muß man berücksichtigen, daß ein Teil der Rekombinantplasmide bereits aussegregiert ist. Aus den Stabilitätsuntersuchungen ist bekannt, daß die in Tab. 7 aufgeführten Stämme pro Generation 1,4-1,7 % an transformierten Zellen verlieren. Für die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Bestimmung wurden die Transformanten 8-10 Generationen auf Vollmedium angezogen. Nach dieser Zeit sollten noch 80-90 % der Zellen in den Kulturen die Rekombinantplasmide enthalten. Der Aktivitätsverlust der ß-Isopropylmalatdehydrogenase unter nichtselektiven Bedingungen ist daher vor allem auf Repression des Enzyms und nicht auf Plasmidverlust zurückzuführen.

Die Ergebnisse in Tab. 7 zeigen, daß die Annahme, daß das leu2-d Allel auf pMP78 schwach exprimiert wird, richtig war. Trotz höherer Kopienzahl von pMP78 in AH22 liegt die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität etwa 5-7mal niedriger als bei den anderen Transformanten, die Plasmide mit dem LEU2 Wildtypgen enthalten. Die Regulation der leu2-d Genexpression hingegen erfolgt ähnlich wie beim Wildstamm und den anderen Transformanten.

3.3.2. LEU2 Wildtypallel und leu2-d Allel auf dem Plasmid YRp7

Um nachzuweisen, daß die hohe Kopienzahl der leu2-d als selektiven Marker tragenden Plasmide die Voraussetzung für das Wachstum ohne Leucin ist, wurde ein DNA-Fragment mit leu2-d in das Plasmid YRp7 integriert, daß in weniger als 6 Kopien pro Zelle vorliegt. Es wurde untersucht, ob Transformanten, die nur einige leu2-d Kopien besitzen, in der Lage sind, ohne Leucin zu wachsen.
YRp7 enthält neben pBR322 das TRP1/ARS1 Fragment mit einer chromosomalen Replikationsstartstelle und keine 2-µm DNA-Sequenzen. Ein PvuI-DNA-Fragment aus pJDB219 mit dem leu2-d Allel wurde in die PvuI-Schnittstelle von YRp7 integriert (Abb. 22). Mit diesem Plasmid YRp7-leu2-d, das zwei selek-

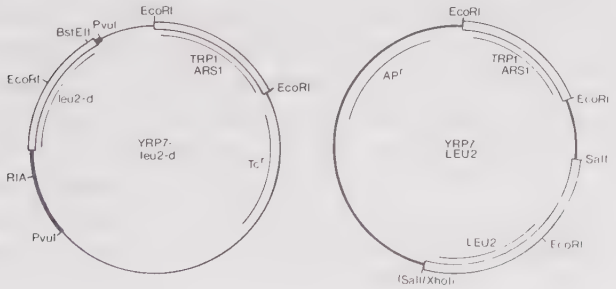


Abb. 22 Restriktionskarten der Plasmide YRp7-leu2-d und YRp7-LEU2, pBR322 (dünne Linien), 2-µm DNA (breite Linien).

tive Marker für Hefe enthält, TRP1 und leu2-d, wurde der Stamm AY2a (leu2, trp1) transformiert. AY2a wurde konstruiert durch Kreuzung von AH22 mit YNN27. Die Transformanten wurden parallel auf Leucin und Tryptophan selektiert. Transformation mit YRp7-leu2-d gelang nur nach Selektion auf Tryptophan. Die leu2 Mutation des Wirtsstammes wurde nicht komplementiert. 7 Tage nach der Transformation waren auf den Platten ohne Leucin nur winzige Kolonien gewachsen, während nach Selektion auf Tryptophan schon nach 3 Tagen Kolonien deutlich zu sehen waren. Ausstriche der AY2a (YRp7-leu2-d) Transformanten, die auf Tryptophan selektiert worden waren, wuchsen allerdings auf Medium ohne Leucin. Zum Vergleich mit YRp7-leu2-d wurde ein YRp7 Plasmid mit dem LEU2 Wildtypallel untersucht. YRp7-LEU2 wurde konstruiert durch Insertion des SalI/XhoI-Fragmentes mit dem LEU2 Gen aus pYe10 in die SalI-Schnittstelle von YRp7 (Abb. 22). Durch Transformation mit YRp7-LEU2 konnte sowohl die trp1 als auch die leu2 Mutation von AY2a komplementiert werden. Nach Selektion auf Tryptophan und auch auf Leucin waren nach 3 Tagen Kolonien gewachsen.

Aus diesem Versuch kann man ableiten, daß das leu2-d Allel in hoher Kopienzahl pro Zelle vorliegen muß, damit es die leu2 Mutation der Wirtsstämme komplementieren kann. Es ist jedoch bemerkenswert, daß AY2a(YRp7-leu2-d) Transformanten, die auf Tryptophan selektiert wurden, in der Lage waren, ohne Leucin zu wachsen, aber direkte Selektion der Transformanten auf Leucin nicht möglich war. Anscheinend unterliegt YRp7-leu2-d der gleichen Kontrolle wie die chromosomale DNA und wird nur einmal pro Zellzyklus repliziert. Deshalb kann wahrscheinlich bei der Regeneration der nichtwachsenden Hefeprotoplasten das Rekombinantplasmid noch nicht in dem Maße repliziert werden, daß die Kopienzahl ausreichen würde, um Wachstum ohne Leucin zu ermöglichen.

3.3.3. Vergleich des leu2-d DNA-Fragmentes mit den LEU2 Wildtypallel DNA-Fragmenten

Die in dieser Arbeit analysierten LEU2 Allele und das leu2-d Allel sind unabhängig voneinander kloniert worden. Um herauszufinden, ob die verschiedenen Eigenschaften dieser Allele auf mögliche Unterschiede in der DNA zurückzuführen sind, wurden die DNA-Sequenzen je eines Teils des leu2-d Allels und eines LEU2 Wildtypallels miteinander verglichen.
Das LEU2 Gen mit Wildtypaktivität auf pHKB52 ist dem Plasmid pYe10 entnommen und stammt aus dem Stamm S288c (Ratzkin und Carbon 1977). Dieses LEU2 Allel wurde sequenziert von Andreadis et al. 1982), und eine Restriktionskarte dieses LEU2 DNA-Fragmentes mit charakteristischen DNA-Bereichen nach Andreadis et al. (1982) ist in Abb. 23a dargestellt. Das LEU2 Strukturgen ist 1,1 kb lang und beginnt 646 Nucleotide von der XhoI-Schnittstelle entfernt. Am 5´Ende vor der Protein codierenden Region liegt ein offenes Leseraster (-151 bis -80), das ein kleines Peptid aus 23 Aminosäuren, von denen 6 Leucin-Moleküle sind, codieren könnte. Mehrere Hinweise deuten daraufhin, daß solche kurzen Leseraster vor dem 5´Ende eines Strukturgens einen Einfluß auf die Genregulation haben könnten, wie zum Beispiel für das Tryptophan-Operon von E. coli gefunden wurde (Yanofsky 1981). Das $tRNA_3^{leu}$ Gen und der Teil der delta-Sequenz auf dem LEU2 DNA-Fragment (Abb. 23a) sollen für die LEU2 Genaktivität ohne Bedeutung sein (Andreadis et al. 1982).
Das zweite LEU2 Wildtypallel, das in dieser Arbeit untersucht wurde, auf dem Plasmid pDB248 vorkommt und dessen Eigenschaften dem des LEU2 Allels auf pHKB52 ähneln, wurde aus chromosomaler DNA des Hefestammes M127 isoliert und über (dA-dT)-Schwänze in die PstI-Schnittstelle der 2-µm DNA integriert (Beggs 1978). Die LEU2 Region auf pDB248 ist 2,4 kb groß und enthält am 5´Ende eine vollständige delta-Sequenz, das $tRNA_3^{leu}$ Gen und eine zweite EcoRI-Schnittstelle (Dobson et al. 1981, Abb. 23b). Die Verdauung von pDB248 mit den Restriktionsenzymen AccI und SalI zeigte, daß das LEU2 DNA-Fragment nur die AccI- aber nicht

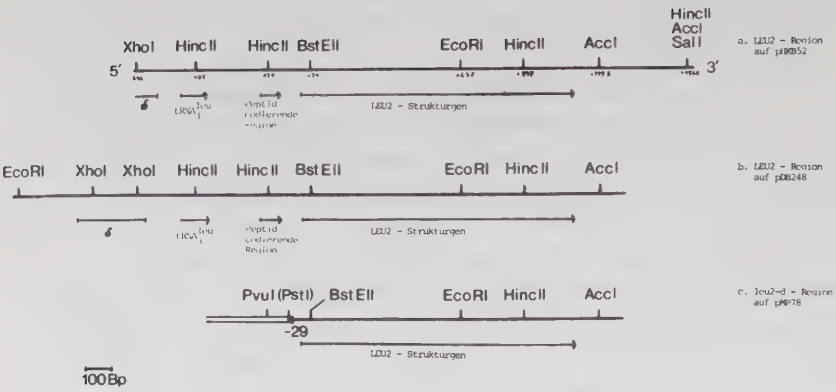


Abb. 23 Restriktionskarten der verschiedenen LEU2 DNA-Regionen; a. auf pHKB52, b. auf pDB248 und c. auf pMP78. Breite Linie: (dA-dT)-Verbindungsregion, Doppellinie: 2-µm DNA-Sequenz.

die SalI-Schnittstelle in der 3´flankierenden Region des LEU2 Strukturgens enthält (Abb. 23b).
Das leu2-d DNA-Fragment, ursprünglich auf pJDB219 kloniert (Beggs 1978) und wie die LEU2 Region auf pDB248 über (dT-dA)-Schwänze in die PstI-Schnittstelle der 2-µm DNA eingebaut, ist etwa 1,3 kb groß. Da das LEU2 Strukturgen bereits 1,1 kb umfasst, wurde nachgeprüft, ob dem leu2-d Allel (1) wichtige regulatorische DNA-Sequenzen fehlen oder ob (2) ein Stück des Strukturgens fehlt. In Abb. 23 wird die Region des leu2-d Allels mit den LEU2 Wildtypallelen verglichen. Das leu2-d Allel enthält am 5´Ende als letzte Schnittstelle die des Enzyms BstEII und am 3´Ende die von AccI (Abb. 23c). Am 3´Ende endet die leu2-d Region etwa 100 bp hinter der AccI-Schnittstelle und ähnelt von der Länge her dem 3´Ende des LEU2 Wildtypallels von pDB248. Daraus kann man schließen, daß das 3´Ende des leu2-d Allels intakt sein muß.
Die verminderte Expression des leu2-d Allels könnte daher auf Deletionen im Bereich des 5´Endes des LEU2 Strukturgens zurückzuführen sein. Zur Untersuchung des leu2-d Allels wurde eine kurze DNA-Sequenz, die von der 5´flan-

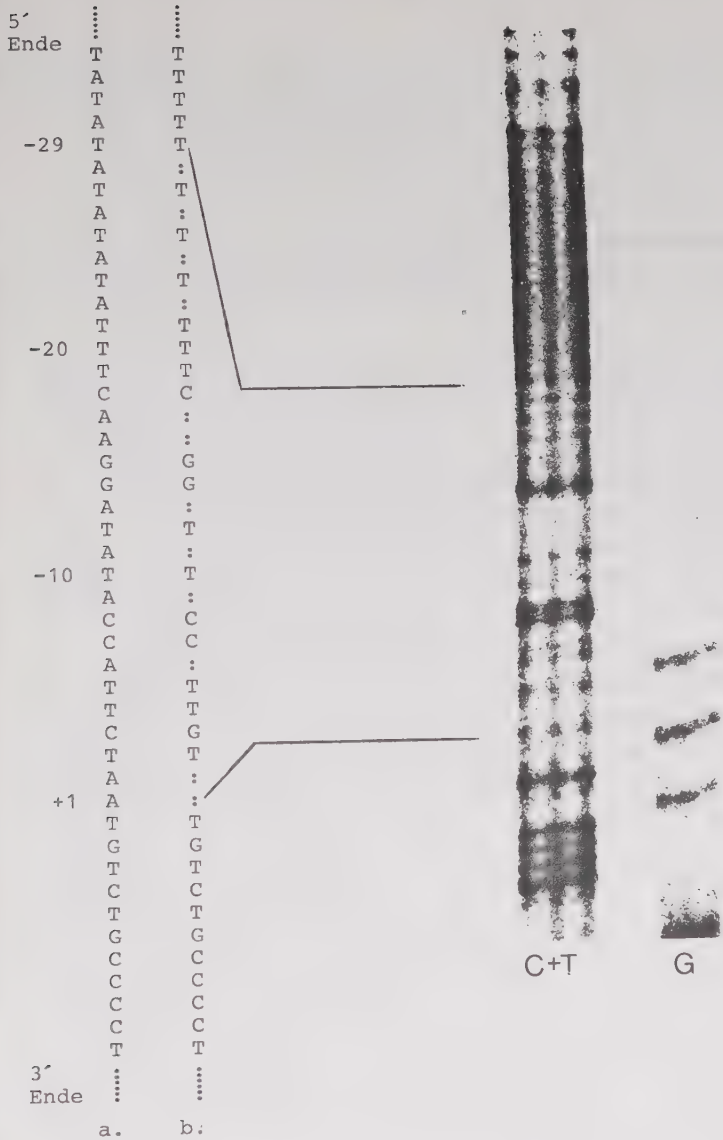


Abb. 24 Ausschnitt aus einem Autoradiogramm des Sequenziergels des BstEII/PvuI-Fragmentes aus pMP78 und Angabe der Basensequenz (b.) und Vergleich mit der DNA-Sequenz (a.) von Andreadis et al. (1982) und Andreadis et al. (persönliche Mitteilung).

kierenden Region bis in das LEU2 Strukturgen hineinreicht, sequenziert. Dazu wurde das Plasmid pMP78 mit BstEII verdaut - die einzige BstEII-Schnittstelle auf pMP78 liegt im leu2-d Fragment - , das 3´Ende mit α^{32}P-dATP markiert und anschließend mit PvuI verdaut. Das etwa 0,2 kb große BstEII/PvuI-Fragment im Bereich des 5´Endes des LEU2 Gens (Abb. 23c), das bis in den 2-µm DNA-Teil von pMP78 reicht, wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) sequenziert.

Ein Ausschnitt aus dem Sequenziergel ist in Abb. 24 zu sehen. Anhand der G- und CT-Spur wurde die Basensequenz vom BstEII-Schnitt am 3´Ende zum 5´Ende hin abgelesen und mit der bekannten Nucleotidsequenz von Andreadis et al. (1982) verglichen. Bis auf die Base G (bei -3) auf dem Gel in Abb. 24, für die ein C in der Sequenz von Andreadis et al. (1982) angegeben ist, stimmen alle Nucleotide überein. Das letzte Nucleotid am 5´Ende auf dem leu2-d DNA-Fragment befindet sich in Position -29 vor dem Startcodon ATG des LEU2 Strukturgens, daran schließen sich etwa 20 Thyminnucleotide an, die als "dunkler Block" in der CT-Spur des Geles in Abb. 24 zu erkennen sind. Dieser Bereich ist die Verbindungsstelle zur PstI geschnittenen 2-µm DNA, deren Sequenz sich beginnend bei der PstI-Schnittstelle anschließt.

Die Untersuchung des 5´Endes des leu2-d Fragmentes hat gezeigt, daß das leu2-d Allel nur eine kurze DNA-Sequenz von 29 Nucleotiden vor der ß-Isopropylmalatdehydrogenase codierenden Region besitzt. Die DNA-Region, die das kleine Leucin-reiche Peptid codieren soll und auf den LEU2 Wildtypallelen vorhanden ist, fehlt völlig. Sehr wahrscheinlich ist die verminderte Expression des leu2-d Allels darauf zurückzuführen, daß am 5´Ende DNA-Sequenzen fehlen, die für eine gute Transkription notwendig sind.

4. Diskussion

4.1. Stabilität der Rekombinantplasmide

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die mitotische Stabilität verschiedener 2-µm DNA-Vektoren in Hefe von dem 2-µm DNA-Fragment und dem selektiven Marker auf dem Plasmid, der Kopienzahl der Plasmide sowie der Anwesenheit endogener 2-µm DNA in der Zelle beeinflußt wird. Rekombinantplasmide mit gesamter 2-µm DNA-Sequenz wie pHKB52 und pJDB219 zum Beispiel sind in CIR^+ und cir^o Stämmen stabiler als Plasmide wie pMP78, das nur ein 2-µm DNA-Fragment mit der Replikationsstartstelle trägt, und pDB248, das ein 2-µm DNA-Fragment mit der Replikationsstartstelle und dem REP2 Gen trägt (Tab. 8). Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Broach und Hicks (1980) und Broach et al. (1981) überein, nach denen für stabile Replikation der 2-µm DNA-Plasmide, den Erhalt in hoher Kopienzahl und die Weitergabe auf Tochterzellen die beiden REP Gene der 2-µm DNA erforderlich sind. Die Plasmide pHKB52 und pJDB219 besitzen diese Gene und sind daher im CIR^+ und cir^o Stamm stabiler als pMP78 und pDB248, denen beide REP Gene bzw. ein REP Gen fehlen.
In CIR^+ Zellen werden die Produkte dieser Gene von der endogenen 2-µm DNA gebildet, und da sie auch in trans aktiv sind (Broach et al. 1981), ermöglichen sie die stabile Replikation von pMP78 und pDB248 im CIR^+ Stamm AH22. Im cir^o Stamm fehlen die REP Gene und Genprodukte völlig. Deshalb können pDB248 und pMP78 im cir^o Stamm YT6-2-1L selbst unter selektiven Bedingungen nicht stabil repliziert werden, was sich in der niedrigen Kopienzahl dieser Plasmide äußert und zum verlangsamten Wachstum der YT6-2-1L(pMP78) und AH22(pDB248) Transformanten führt. Unter nichtselektiven Bedingungen verlieren die YT6-2-1L Transformanten innerhalb weniger Generationen alle pMP78 und pDB248 Moleküle, während die Verlustrate für diese Plasmide im CIR^+

Tab. 8 Stabilität verschiedener Rekombinantplasmide (in % Verlust an Transformanten pro Generation) und ihre Kopienzahlen im CIR^+ Stamm AH22 und im cir^o Stamm YT6-2-1L unter nichtselektiven Wachstumsbedingungen.

Plasmid	Stabilität in AH22	Stabilität in YT6-2-1L	Kopienzahl in AH22	Kopienzahl in YT6-2-1L
pMP78	1,6	20	hoch	niedrig
pDB248	1,7	20	niedrig	niedrig
pJDB219	1,0	0,9	hoch	hoch
pHKB52	1,4	1,0	niedrig	hoch

Stamm AH22 viel niedriger ist (Tab. 8).
Hollenberg et al. (1981) berichteten, daß pMP78, das als selektiven Marker das leu2-d Allel trägt, unter nichtselektiven Bedingungen im cir^o Stamm YT6-2-1L ähnlich stabil wie im CIR^+ Stamm AH22 sei. Als nichtselektives Medium verwendeten sie Minimalmedium plus 20 µg Leucin pro ml. Wie die Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase, dem LEU2 Genprodukt gezeigt haben, bewirkt Leucin in dieser Konzentration keine Repression des Enzyms. In Gegenwart solcher niedrigen Leucin-Konzentrationen wachsen die Transformanten demnach unter selektiven Bedingungen und sind daher stabiler als unter nichtselektiven Wachstumsbedingungen.
Stabilitätsunterschiede, die auf bestimmten bakteriellen DNA-Sequenzen auf den Rekombinantplasmiden beruhen, wurden nicht beobachtet. Allerdings scheinen Plasmide, die nur Hefe-DNA enthalten, stabiler zu sein als Moleküle, die zusätzlich bakterielle Plasmide tragen. Ein Beispiel dafür ist das Plasmid 2-µmleu2, das durch in vivo Rekombiantion aus 2-µm DNA und pMP78 entstanden ist. 2-µmleu2 enthält die gesamte 2-µm DNA-Sequenz und das leu2-d Allel. In seiner Größe und den DNA-Sequenzen ähnelt dieses Molekül sehr stark der natürlichen 2-µm DNA, was wahrscheinlich die Ursache für die hohe Stabi-

lität von 2-µmleu2 ist. Ein ähnliches Ergebnis wie für 2-µmleu2 erhielten Toh-E et al. (1980) für ein Plasmid, das nur aus dem HindIII-Fragment 3 der 2-um DNA und dem leu2-d Allel bestand. Obwohl diesem Molekül eigene REP Gene fehlen, war es im CIR^+ Stamm stabiler als pJDB219. Dieses Ergebnis steht also im Widerspruch zu den Daten dieser Arbeit, wonach Plasmide mit eigenen REP Genen stabiler sind als solche, die diese Gene nicht enthalten.

Während pDB248 und pMP78 nur in Gegenwart endogener 2-µm DNA stabil repliziert werden, sind Plasmide mit gesamter 2-µm DNA-Sequenz wie zum Beispiel pJDB219 und pHKB52 im cir^o Stamm YT6-2-1L stabiler als im CIR^+ Stamm AH22 (Tab. 8). Besonders stark ist der negative Effekt der endogenen 2-µm DNA auf pHKB52: AH22(pHKB52) Transformanten segregieren fast doppelt so schnell aus wie YT6-2-1L (pHKB52) Transformanten. Auch Blanc et al. (1979) beobachteten, daß Rekombinantplasmide mit gesamter 2-µm DNA-Sequenz in einem cir^o Stamm stabiler als in einem CIR^+ Stamm waren.
Diese Ergebnisse deuten auf Inkompatibilität zwischen rekombinanten und endogenen 2-µm DNA-Molekülen hin. Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Kopienzahlbestimmungen der 2-µm DNA-Plasmide in AH22, AH22(pMP78) und AH22 (pDB248) Transformanten. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Menge endogener 2-µm DNA-Moleküle in nichttransformierten AH22 Zellen in etwa der Anzahl an endogenen und rekombinanten 2-µm DNA-Molekülen in Transformanten entspricht. Ähnliche Beobachtungen machten auch Gerbaud und Guerineau (1980) bei anderen Hefestämmen.
Da nur eine bestimmte Anzahl an 2-µm DNA-Molekülen pro Zelle etabliert werden kann, konkurrieren in transformierten Zellen die endogene 2-µm DNA und das Rekombinantplasmid um das Replikations- und/oder Transmissionssystem der 2-µm DNA. Unter Bedingungen, die selektiv für Gene auf dem Rekombinantplasmid sind, und unter denen die Zelle auf das Rekombinantplasmid angewiesen ist um zu wachsen,

wird ein Teil der endogenen 2-µm DNA-Moleküle aus der Zelle verdrängt und durch rekombinante Moleküle ersetzt, wie die Bestimmungen der Plasmidkopienzahlen deutlich gezeigt haben. Dadurch sind in Transformanten weniger natürliche 2-µm DNA-Moleküle enthalten als im nichttransformierten Wirtsstamm.

Die meisten der untersuchten Rekombinantplasmide liegen in niedriger Kopienzahl vor. 20-30 % der Plasmidmoleküle in CIR^+ Transformanten sind Rekombinantplasmide, 70-80 % endogene 2-µm DNA-Moleküle. Die Anzahl an Rekombinantplasmidmolekülen ist offensichtlich unabhängig davon, ob die 2-µm DNA-Vektoren die gesamte 2-µm DNA oder nur ein 2-µm DNA-Fragment enthalten. So liegen zum Beispiel pDB248 und pHKB52 oder pMP78 und pJDB219 in vergleichbaren Kopienzahlen vor (Tab. 8).

Im cir^O Stamm steht das gesamte Replikations- und Transmissionssystem der 2-µm DNA zur Verfügung für den Erhalt der Rekombinantplasmide. Daher ist die Kopienzahl von pJDB219 und pHKB52 im cir^O Stamm YT6-2-1L höher als im isogenen CIR^+ Stamm AH22. Die höhere Stabilität von pJDB219 und pHKB52 in YT6-2-1L läßt sich damit erklären, daß keine Kompetition mit endogener 2-µm DNA besteht, und daß Plasmide, die in höherer Kopienzahl vorliegen, langsamer aussegregieren als solche, die in nur wenigen Molekülen pro Zelle vorkommen.

Normalerweise wird in Transformanten bevorzugt endogene 2-µm DNA repliziert, was sich darin zeigt, daß die meisten Zellen zum größten Teil endogene 2-µm DNA und wesentlich weniger Rekombinantplasmidmoleküle enthalten, und daß das Rekombinantplasmid unter nichtselektiven Bedingungen aussegregiert und endogene 2-µm DNA in der Zelle erhalten bleibt. Umgekehrt ist die Situation bei AH22 Zellen, die mit Plasmiden transformiert wurden, die das leu2-d Fragment als selektiven Marker enthalten wie zum Beispiel pMP78 und pJDB219. Unter selektiven Bedingungen werden diese Moleküle bevorzugt repliziert und auf Tochterzellen vererbt. In AH22(pMP78) und AH22(pJDB219) Transformanten sind

80-90 % der Plasmide rekombinante Moleküle, der Anteil an endogener 2-µm DNA ist dementsprechend niedrig. Einige Transformantenkolonien haben schon direkt nach der Transformation alle natürlichen 2-µm DNA-Moleküle verloren. Auf die hohe Kopienzahl der Plasmide mit dem leu2-d Marker ist wahrscheinlich auch die höhere Stabilität der Transformanten mit diesen Plasmiden zurückzuführen. Leu2-d Plasmide sind stabiler als ähnlich konstruierte Plasmide mit anderen selektiven Markergenen oder LEU2 Allelen. So ist pJDB219 stabiler als pHKB52 (Tab. 8). Der Stabilitätsunterschied zwischen pMP78 und pDB248 ist nur gering, obwohl pMP78 in höherer Kopienzahl als pDB248 vorliegt. Das ist darauf zurückzuführen, daß bei der Teilung der AH22 (pMP78) Transformanten ständig cir^{o} $pMP78^{+}$ Zellen entstehen, die sehr instabil sind und das Rekombinantplasmid unter nichtselektiven Bedingungen schnell verlieren.

Es ist interessant festzustellen, daß pMP78 auch dann in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegt, wenn nur wenige endogene 2-µm DNA-Moleküle und damit auch REP Genkopien vorhanden sind wie im Fall der AH22(pMP78) Transformanten, die etwa 5 2-µm DNA und 30 pMP78 Moleküle enthalten. Das bedeutet, daß anscheinend wenige REP Genprodukte ausreichen, um stabile Replikation und Transmission der 2-µm DNA-Plasmide zu bewirken.
Eine weitere Frage ist, wie die Zelle innerhalb weniger Generationen die Kopienzahl an pMP78 Molekülen erhöhen kann. Nach Untersuchungen von Zakian et al. (1979) wird jedes 2-µm DNA-Molekül nur einmal pro Zellzyklus repliziert. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit muß pMP78 bereits vor der Zellteilung mehrmals repliziert werden, damit die hohe Anzahl an pMP78 Molekülen gebildet werden kann. Broach (1981) konnte zeigen, daß in Gegenwart der REP Gene unter bestimmten Umständen die Zellzykluskontrolle der 2-µm DNA-Replikation umgangen wird: Zellen, die bei der Teilung nur 1-2 2-µm DNA-Moleküle erhalten, können in Gegenwart der REP Genprodukte die Anzahl der 2-µm DNA-Moleküle innerhalb

weniger Generationen auf 30 erhöhen. Auch Versuche von Sigurdson et al. (1981) deuten darauf, daß die 2-µm DNA mehrmals pro Zellzyklus repliziert werden kann, wenn Zellen durch Cytoduktion nur wenige 2-µm DNA-Moleküle erhalten haben.
Plasmide wie zum Beispiel YRp7-leu2-d, die als Replikationsstartstelle chromosomale ARS Sequenzen enthalten, können anscheinend nicht wie 2-µm DNA-Plasmide amplifiziert werden und stehen unter strengerer Zellzykluskontrolle.

4.2. 2-µm DNA-Verlust nach Transformation

Durch Rekombinantplasmide wie pMP78 und pJDB219, die das leu2-d Allel als selektiven Marker tragen und in hoher Kopienzahl in AH22 vorliegen, gehen alle endogenen 2-µm DNA-Moleküle bei der Segregation aus der Zelle verloren. Auf diese Weise kommt es zur Entstehung von cir^{O} Zellen. Da in AH22(pMP78) Transformanten 80 % der Plasmide pMP78 Moleküle und nur 20 % endogene 2-µm DNA-Moleküle sind, ist es wahrscheinlich, daß die durch Knospung entstehende Tochterzelle nur pMP78 und keine natürlichen 2-µm DNA-Moleküle erhält. Solche cir^{O} $pMP78^{+}$ Zellen verlieren unter nichtselektiven Bedingungen sehr schnell auch pMP78, das nur in Gegenwart endogener 2-µm DNA stabil repliziert werden kann, und die Zellen werden cir^{O} $pMP78^{O}$. Diese cir^{O} $pMP78^{O}$ Zellen unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften nicht vom CIR^{+} Ausgangsstamm. Abkömmlinge von AH22(pMP78) Transformanten, die nur das Rekombinantplasmid verloren hatten und noch endogene 2-µm DNA enthielten, wurden sehr selten gefunden. Das zeigt, daß bei der Zellteilung von CIR^{+} $pMP78^{+}$ Zellen offensichtlich meist nur CIR^{+} $pMP78^{+}$ oder cir^{O} $pMP78^{+}$ Tochterzellen entstehen.

Das Phänomen des 2-µm DNA-Verlustes nach Transformation wurde auch von anderen Autoren beobachtet und scheint nicht auf einen speziellen Hefestamm beschränkt zu sein. Dobson et al. (1980a) und Toh-E und Wickner (1981) beschrieben das Auftreten von cir^{O} Zellen nach Transformation mit dem

Plasmid pJDB219. Da pJDB219 im Gegensatz zu pMP78 auch im cir^{o} Stamm stabil ist, ist die Kurierung der 2-µm DNA nach Transformation mit pJDB219 nicht so leicht zu erkennen.

4.3. Eigenschaften der leu2-d Plasmide

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Plasmide mit dem leu2-d Allel als selektivem Marker im Unterschied zu Plasmiden mit anderen Markern in hoher Kopienzahl in den Transformanten vorliegen. Die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide konnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es auf Grund bestimmter DNA-Sequenzen auf dem leu2-d Fragment zur bevorzugten Replikation solcher Plasmide kommen. Zum anderen könnte das leu2-d Allel schwach exprimiert werden, was die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide und damit auch die große Anzahl an leu2-d Genkopien zur Voraussetzung für das Wachstum ohne Leucin macht.
Durch selektive und nichtselektive Transformation von AH22 mit dem Plasmid pADH040-2 wurde gezeigt, daß die hohe Kopienzahl dieses leu2-d Plasmides und der damit verbundene Verlust der 2-µm DNA nur nach Selektion der Transformanten auf Leucin auftrat. Dieses Ergebnis deutete auf verminderte Expression des leu2-d Allels. Diese Vermutung konnte durch die Untersuchung der ß-Isopropylmalatdehydrogenase, dem LEU2 Genprodukt, bestätigt werden. Die Enzymaktivität in AH22(pMP78) Transformanten war 5-7mal niedriger als in AH22(pDB248) und AH22(pHKB52) Transformanten, die Plasmide mit anderen LEU2 Allelen enthalten, obwohl die Kopienzahl von pMP78 etwa dreimal so hoch wie die von pDB248 und pHKB52 ist. Dies zeigt, daß das leu2-d Allel defekt ist, es besitzt nur etwa 10 % der Wildtypaktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase. Durch Erhöhung der leu2-d Kopien pro Zelle kann die LEU2 Gesamtaktivität heraufgesetzt werden. Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität in AH22(pMP78) Transformanten, die etwa 30 pMP78 Moleküle enthalten, liegt ungefähr dreimal so hoch wie im Wildstamm.
Die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide ist direkt mit der schwachen Expression des leu2-d Allels korreliert. Nach

Insertion des LEU2 Wildtypgens in das leu2-d Plasmid pMP80 kam es zur Herabsetzung des Anzahl an Rekombinantplasmidmolekülen, während die Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase anstieg.
Einen ähnlichen Effekt beobachtete Beggs (1981): Nach Insertion des URA3 Gens in ein leu2-d Plasmid und anschließender Selektion auf Uracil war die Kopienzahl des Plasmids 5-10 mal niedriger als nach Selektion auf Leucin.

Durch die schwache Expression des leu2-d Allels läßt sich auch das langsamere und unterschiedlich schnelle Koloniewachstum von Transformanten mit leu2-d Plasmiden auf Minimalmedium erklären. Die Zellen, die bei der Transformation oder Zellteilung viele Rekombinantplasmidmoleküle und damit leu2-d Kopien erhalten, besitzen von Anfang an eine genügend hohe ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität, um auf Minimalmedium zu wachsen. Sie können schneller wachsen als Zellen, die nur wenige leu2-d Plasmidmoleküle erhalten haben, die zunächst die Anzahl an leu2-d Kopien erhöhen müssen, ehe sie beginnen können sich zu teilen. Wahrscheinlich muß sogar von Anfang an eine bestimmte ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität vorhanden sein und damit auch leu2-d Genkopien, damit die Protoplasten nach der Transformation unter selektiven Bedingungen überhaupt in der Lage sind zu regenerieren. So könnte man erklären, daß die Transformationsrate von leu2-d Plasmiden bei nichtselektiver Transformation etwa doppelt so hoch ist wie bei selektiver (Reipen 1982).
Ist das leu2-d Allel auf einem Plasmid wie YRp7 lokalisiert, das in weniger als 6 Kopien pro Zelle vorliegt, ist es nicht möglich, durch Selektion auf Leucin Transformanten zu isolieren.
Die schwache Expression des leu2-d Allels könnte auch die Ursache dafür sein, daß die Transformationsfrequenz von Schizosaccharomayces pombe bei nur 1-2 Transformanten pro µg pJDB219 DNA lag (Beach und Nurse 1981). S. pombe ist ein natürlicher cir^{O} Stamm und kann 2-µm DNA-Plasmide nicht stabil replizieren. Die Kopienzahl der Plasmide ist deshalb selbst unter selektiven Bedingungen sehr niedrig.
Die wenigen leu2-d Kopien auf den Plasmidmolekülen reichen

nicht aus, um Wachstum ohne Leucin zu ermöglichen. Die Transformationsrate von pDB248, das ein LEU2 Wildtypallel trägt, lag für S. pombe hingegen bei 10^4 Transformanten pro µg DNA.

In AH22(pMP78) Transformanten liegt die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität trotz der schwachen Expression des leu2-d Allels etwa dreimal höher als im Wildstamm. Anscheinend ist die Hefezelle nicht in der Lage, die Anzahl an Rekombinantplasmidmolekülen genau zu regulieren und auf ein Minimum zu beschränken. Wenn in einer Transformantenzelle erst einmal mehr als 50 % der Plasmidmoleküle in Form des Rekombinantplasmids pMP78 vorliegen, ist das Gleichgewicht zwischen pMP78 und endogenen 2-µm DNA-Molekülen zugunsten des Rekombinantplasmids verschoben. Es wird bevorzugt pMP78 repliziert, wobei die Kopienzahl dieses Moleküls noch weiter ansteigt. Daher kommt es selbst in Transformanten mit leu2-d Plasmiden zur Überproduktion der ß-Isopropylmalatdehydrogenase.

Die Tatsache, daß auch weniger leu2-d Genkopien als in AH22(pMP78) Transformanten vorhanden zum Wachstum ausreichen, zeigen die AH22(pARS040-2) Transformanten. PARS040-2 ist ein leu2-d Plasmid, das unter selektiven Bedingungen etwa 20 % der 2-µm DNA-Moleküle (etwa 8 Moleküle) pro Zelle ausmacht und keinen 2-µm DNA-Verlust hervorruft. Das Plasmid pARS040-2 enthält neben dem Replikationsstartbereich der 2-µm DNA die ARS1 Sequenz mit einem chromosomalen Replikationsstartpunkt. Möglicherweise ist ist die ARS1 Sequenz dominant über die 2-µm DNA-Replikationssequenz und verhindert daher die Amplifikation der pARS040-2 Moleküle. Für die niedrigere Kopienzahl von pARS040-2 im Gegensatz zu pADH040-2, das sich von pARS040-2 dadurch unterscheidet, daß es nicht die ARS1 Sequenz enthält, sprechen auch Untersuchungen von Reipen (1982), die gezeigt haben, daß die ß-Lactamase-Aktivität von AH22 (pARS040-2) Transformanten nur etwa halb so hoch ist wie in AH22(pADH040-2) Transformanten.

4.4. LEU2 Expression und Regulation in Transformanten

Das leu2-d Allel wird schwach exprimiert und besitzt nur etwa 10 % der Wildtypaktivität. Die Regulation der ß-Isopropylmalatdehydrogenase erfolgt aber anscheinend wie im Wildstamm. In Gegenwart höherer Leucin-Konzentrationen kommt es zum teilweisen Abfall der Enzymaktivität bei AH22(pMP78) und AH22(pHKB52) Transformanten sowie im Wildstamm. Nach Anzucht auf Vollmedium, also in Gegenwart von Leucin und Threonin, kommt es in allen untersuchten Stämmen zum nahezu vollständigen Verlust der ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität. Diese Daten stimmen mit denen von Kohlhaw et al. (1980) und Hsu und Kohlhaw (1982) überein, die die Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase in einem Wildstamm und Transformanten, die Plasmide mit einem LEU2 Wildtypallel trugen, bestimmten.

Die hohe Aktivität der ß-Isopropylmalatdehydrogenase in AH22 (pHKB52) und AH22(pDB248) Transformanten im Vergleich zum Wildstamm ist auf die hohe Anzahl an LEU2 Genkopien zurückzuführen. Das auf pHKB52 und pDB248 lokalisierte LEU2 Gen führt zur gleichen Enzymaktivität pro Genkopie wie das chromosomale LEU2 Gen im Wildstamm. Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität stimmt etwa mit der Anzahl an LEU2 Genkopien pro Zelle überein.

Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase in allen untersuchten Transformanten einschließlich der Transformanten mit leu2-d Plasmiden wie zum Beispiel AH22(pMP78) wird anscheinend wie im Wildstamm reguliert. Da die Regulation des Enzyms prätranslational erfolgen soll (Kohlhaw et al. 1980), kann man davon ausgehen, daß die LEU2 Fragmente auf pHKB52 und pDB248 sowie das leu2-d Allel auf pMP78 neben der genetischen Information für die ß-Isopropylmalatdehydrogenase auch regulatorische DNA-Regionen enthalten.

Über die Regulation des LEU2 Gens ist bisher nur bekannt, daß es zusammen mit dem LEU1 Gen, das auf einem anderen Chromosom liegt (Mortimer und Schild 1980), kontrolliert wird. Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase steht unter spezi-

fischer Kontrolle von Leucin und Leucin plus Threonin. Die Wirkung dieser Aminosäuren auf das LEU2 Genprodukt soll eine indirekte sein (vergleiche Abb. 21). Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase und die α-Isopropylmalatisomerase, das LEU1 Genprodukt, sollen induziert werden durch α-Isopropylmalat, dem Produkt der α-Isopropylmalatsynthase, die vom LEU4 Gen codiert wird. Die α-Isopropylmalatsynthase ihrerseits unterliegt der Endproduktheмmung durch Leucin und Leucin plus Threonin (Satyanarayana et al. 1968).
Der genaue Mechanismus der Regulation des LEU2 Gens ist bisher noch nicht bekannt. Nach Vorstellungen von Kohlhaw (1982) soll ein bestimmtes Induktormolekül an α-Isopropylmalat binden. Der α-Isopropylmalat-Induktorkomplex könnte eine mögliche Haarnadelstruktur , die im Promotorbereich des LEU2 Gens existiert und als Terminationsstelle für die Transkription in Frage kommen kann, destabilisieren und so die Transkription des LEU2 Gens ermöglichen.
In einem anderen Modell zur Regulation der LEU2 Expression soll ein kleines Leucin-reiches Peptid, das vor dem 5´Ende des LEU2 Gens codiert werden könnte, die LEU2 Transkription kontrollieren (Andreadis et al. 1982). In Analogie zum Attenuationsmodell bei bakteriellen Operons (Yanofsky 1981) soll in Gegenwart von Leucin dieses "Leitpeptid" gebildet werden, das sekundäre Haarnadelstrukturen auf der DNA vor dem LEU2 Startcodon stabilisieren soll, so daß es zur vorzeitigen Termination der Transkription kommt.
Diese beiden Modelle könnten für die Regulation der LEU2 Expression im Wildstamm und den Transformanten, die Plasmide mit dem LEU2 Wildtypallel enthalten, in Frage kommen, da diese Stämme LEU2 DNA-Regionen enthalten, die den DNA-Bereich mit den Sequenzen, die Haarnadelstrukturen ausbilden könnten, enthalten. Dem leu2-d Allel fehlen diese für die LEU2 Genregulation nach den oben beschriebenen Modellen notwendigen DNA-Sequenzen völlig. Es besitzt am 5´Ende vor dem Startcodon des LEU2 Strukturgens nur eine kurze DNA-Sequenz von 29 bp. Da das leu2-d Allel offensichtlich normal reguliert wird, ist es fraglich, ob die oben erwähnten Modelle zur LEU2 Regulation tatsächlich zutreffend sind und die Angriffsstelle für die Regulation des

LEU2 Gens am 5´Ende vor dem Strukturgen liegt. Man könnte sich vorstellen, daß die DNA-Region für die LEU2 Regulation im Bereich des LEU2 Strukturgens liegt. Mögliche Regulationsproteine wie das postulierte kleine Leucin-reiche Peptid könnten die Konformation der LEU2 codierenden Region so verändern, daß es zur vorzeitigen Termination der Transkription im Bereich des LEU2 Strukturgens kommt. In Transformanten mit leu2-d Plasmiden könnte das kleine Peptid vom Chromosom codiert werden, denn die leu2 Mutation des Wirtsstammes AH22 beruht auf zwei Punktmutationen im LEU2 Strukturgen.

Eine weitere Möglichkeit, die die Regulation des leu2-d Allels ohne regulatorische DNA-Bereiche am 5´Ende vor dem Startcodon des LEU2 Strukturgens erklären könnte, wäre die konstitutive Bildung eines inaktiven LEU2 Transkripts, das durch regulatorische Verbindungen in seiner Konformation so verändert wird, daß es translatiert werden kann. Weiterhin könnte es auch zur intragenen Komplementation zwischen dem defekten LEU2 Genprodukt, das vom chromosomalen LEU2 Gen gebildet und normal reguliert wird, und dem Genprodukt des leu2-d Allels kommen. Die ß-Isopropylmalatdehydrogenase besteht aus zwei Untereinheiten. Man könnte sich vorstellen, daß aktive ß-Isopropylmalatdehydrogenase nur dann gebildet wird, wenn sich die Untereinheit, die vom chromosomalen LEU2 Gen codiert wird, mit der, die vom leu2-d Allel kommt, zusammenlagert. Allerdings sollte in solchem Fall die Enzymaktivität in den Transformanten nicht über der des Wildstammes liegen. AH22(pMP78) Transformanten besitzen aber eine dreimal höhere ß-Isopropylmalatdehydrogenase-Aktivität als der Wildstamm, so daß diese Möglichkeit ausgeschlossen scheint.

Offensichtlich wird das leu2-d Allel normal reguliert aber schwach exprimiert. Die verminderte Expression des leu2-d Allels ist wahrscheinlich auf herabgesetzte Transkription zurückzuführen, hervorgerufen durch die Deletion im Promotor-Bereich am 5´Ende des leu2-d Fragmentes.

Nach bisher vorliegenden Daten sollen für die Transkription eukaryontischer Gene zwei DNA-Elemente im Bereich vor dem

Strukturgen erforderlich sein (Breathnach und Chambon 1981). So besitzen alle Gene offensichtlich eine TATAAA-ähnliche Sequenz in verschiedenen Abständen, häufig etwa 30 bp, und einen zweiten DNA-Bereich, etwa 100-150 bp, vor dem Startcodon des Strukturgens, der die abwärtsliegenden DNA-Sequenzen für die RNA-Polymerase zugänglich machen soll. Struhl (1981) fand für das HIS3 Gen aus Hefe, daß Deletionen im Bereich von 113-65 bp vor der HIS3 codierenden Region die Transkriptionsrate herabsetzten. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Faye et al. (1981) für das CYC1 Gen aus Hefe, wo Deletionen im Bereich von 242-139 bp und 99-75 bp vor dem ersten Codon des CYC1 Strukturgens die Transkription verminderten.

Das leu2-d Allel besitzt am 5´Ende vor dem Strukturgen nur noch 29 bp der ursprünglichen Sequenz, an die sich etwa 20 Thymin-Nucleotide als Verbindungssequenz und dann die 2-µm DNA-Sequenz anschließen. Nach Ergebnissen von Andreadis et al. (persönliche Mitteilung) wird in dereprimierten Zellen eine LEU2 mRNA von etwa 1250 bp gebildet, deren Transkriptionsstart 17 bp vor dem Startcodon der LEU2 codierenden Region liegen soll. Dieser Punkt ist auf dem leu2-d Allel vorhanden, so daß auch hier dieses 1250 bp Transkript gebildet werden könnte, wenn außerdem noch die RNA-Polymerase-Bindungsstelle auf dem leu2-d Allel liegt. Dem leu2-d Allel fehlt allerdings der zweite postulierte DNA-Bereich, 100 -150 bp vor dem Startcodon des Strukturgens, der für effektive Transkription notwendig sein soll. Die Funktion dieses DNA-Bereiches kann anscheinend nur zu einem Teil von der an das leu2-d Fragment angrenzenden poly(dT)-Region und den sich daran anschließenden 2-µm DNA-Sequenzen auf den Plasmiden übernommen werden, so daß die Transkription des leu2-d Allels nicht so effektiv wie die des LEU2 Wildtypallels ist. ist.

Um genaue Aussagen über die Expression und Regulation des leu2-d Allels machen zu können, müßten die Transkripte des leu2-d Allels unter reprimierten und dereprimierten Wachstumsbedingungen untersucht werden. Ein Vergleich zwischen

dem LEU2 Wildtypallel und dem leu2-d Allel sollte zeigen, ob die schwache Expression des leu2-d Allels nur auf verminderte Transkription zurückzuführen ist, oder ob andere Transkripte gebildet werden, deren Startpunkte zum Beispiel von denen des Wildtypgens abweichen.

5. Zusammenfassung

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, daß die Stabilität von 2-µm DNA-Vektoren in Hefe hauptsächlich von den 2-µm DNA-Sequenzen auf den Plasmiden bestimmt wird. Rekombinantplasmide mit gesamter 2-µm DNA waren stabiler als solche, die nur ein 2-µm DNA-Fragment ohne die beiden REP Gene enthielten. Plasmide mit gesamter 2-µm DNA waren im cir^{O} Stamm stabiler als im CIR^{+} Stamm, während Plasmide mit 2-µm DNA-Fragmenten ohne die beiden REP Gene nur im CIR^{+} Stamm stabil repliziert wurden. Neben der 2-µm DNA kann der selektive Marker die Stabilität beeinflussen. Plasmide mit dem leu2-d Allel waren stabiler als ähnlich konstruierte Plasmide mit anderen Markergenen oder LEU2 Allelen. Die Wahl des bakteriellen Vektors hatte keinen Effekt auf die Stabilität von 2-µm DNA-Rekombinantplasmiden.

Die DNA-Analyse verschiedener Hefetransformanten ergab, daß die meisten der untersuchten Rekombinantplasmide in niedrigerer Kopienzahl als die endogene 2-µm DNA vorliegen und 20-30 % der Plasmidmoleküle in der Zelle ausmachen.

Transformanten mit leu2-d Plasmiden wie pMP78 besitzen besondere Eigenschaften. Im Gegensatz zu Plasmiden mit anderen Markern lagen Moleküle mit dem leu2-d Allel in höherer Kopienzahl als endogene 2-µm DNA vor. Sie machten mehr als 80 % der Plasmidmoleküle aus und verdrängten mit hoher Frequenz alle endogenen 2-µm DNA-Moleküle aus der Zelle. So waren nach 50 Generationen nichtselektiven Wachstums 80 % aller AH22(pMP78) Transformanten cir^{O} geworden.

Die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide, die den Verlust der endogenen 2-µm DNA verursacht, ist zurückzuführen auf die schwache Expression des leu2-d Allels. Die Untersuchung der ß-Isopropylmalatdehydrogenase, dem LEU2 Genprodukt, zeigte, daß das leu2-d Allel defekt ist und nur 10 % der Wildtypaktivität besitzt. Die Regulation des leu2-d Allels erfolgt wie beim LEU2 Wildtypallel. Da das leu2-d Allel schwach exprimiert wird, ist die hohe Kopienzahl der leu2-d Plasmide

Voraussetzung für das Wachstum unter selektiven Bedingungen ohne Leucin. Nur nach Selektion der Transformanten auf Leucin lagen Rekombinantplasmide mit dem leu2-d Allel in hoher Kopienzahl vor und verursachten den Verlust der endogenen 2-µm DNA. Insertion eines zweiten, 2-µm DNA nichtkurierenden LEU2 Allels mit Wildtypaktivität in ein leu2-d Plasmid führte zur Reduktion der Kopienzahl. Mit dem Plasmid YRp7-leu2-d, das in wenigen Kopien in der Hefezelle vorliegt und nicht wie 2-µm DNA-Plasmide amplifiziert werden kann, konnte die leu2 Mutation des Wirtsstammes durch Transformation nicht komplementiert werden.

Die Untersuchung des 5´Endes der DNA-Sequenz des leu2-d Allels zeigte, daß im Promotorbereich vor der LEU2 codierenden Region nur 29 bp der ursprünglichen Sequenz vorhande sind. Diese Deletion am 5´Ende des LEU2 Gens ist wahrscheinlich die Ursache für die schwache Expression des leu2-d Allels.

Das leu2-d Plasmid pARS040-2, das neben der Replikationsstartstelle der 2-µm DNA die ARS1 Sequenz mit einem chromosomalen Replikationsstartpunkt enthält, liegt im Gegensatz zu anderen leu2-d Plasmiden in nur etwa 8 Molekülen pro Zelle vor und bewirkt keinen 2-µm DNA-Verlust.

6. Literaturverzeichnis

Anderson, E.S., Lewis, M.J. (1965). Drug resistance and its transfer in Salmonella typhimurium. Nature 206, 579-583.

Andreadis, A., Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B., Hermodson, M., Schimmel, P. (1982). Nucleotide sequence of yeast LEU2 shows 5´-noncoding region has sequences cognate to leucine. Cell 31, 319-325.

Beach, D., Nurse, P. (1981). High frequency transformation of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Nature 290, 140-142.

Beggs, J.D. (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275, 104-109.

Beggs, J.D., van den Berg, J., van Ooyen, A., Weissmann, C. (1980). Abnormal expression of chromosomal rabbit ß-globin gene in Saccharomyces cerevisiae. Nature 283, 835-840.

Beggs, J.D. (1981). Multiple-copy yeast plasmid vectors. In: Molecular Genetics in Yeast, eds. von Wettstein, D., Friis, J., Kielland-Brandt M., Stenderup, A., Munksgaard, Copenhagen, Alfred Benzon Symp. 16, 383-390.

Bernardi, G., Faures, M., Piperno, G., Slonimski, P.P. (1970). Mitochondrial DNA´s from respiratory-sufficient and cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeasts. J. Mol. Biol. 48, 23-42.

Blanc, H., Gerbaud, C., Slonimski, P.P., Guerineau, M. (1979). Stable yeast transformation with chimeric plasmids using a 2µm-circular DNA-less strain as a recipient. Molec. gen. Genet. 176, 335-342.

Bolivar, R., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose system. Gene 2, 95-113.

Bolivar, F. (1978). Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. Gene 4, 121-136.

Breathnach, R., Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383.

Broach, J.R., Atkins, J.F., McGill, C., Chow, L. (1979). Identification and mapping of the transcriptional and translational products of the yeast 2µ circle. Cell 16, 827-839.

Broach, J.R., Hicks, J.B. (1980). Replication and recombination functions associated with the yeast 2µ circle. Cell 21, 501-508.

Broach, J.R. (1981). The yeast 2μ circle. In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance. Eds. Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R., Cold Spring Harbor Laboratory, 11A, 445-470.

Broach, J.R., Guarascio, V.R., Misiewicz, M.H., Campbell, I.L. (1981). Replication of the yeast 2μ circle. In: Molecular Genetics in Yeast, eds. von Wettstein, D., Friis, J., Kielland-Brandt, M., Stenderup, A., Munksgaard, Copenhagen, Alfred Benzon Symp. 16, 227-236.

Broach, J.R., Guarascio, V.R., Jayaram, M. (1982). Recombination within the yeast plasmid 2μ circle is site-specific. Cell 29, 227-234.

Brown, H.D., Satyanarayana, T., Umbarger, H.E. (1975). Biosynthesis of branched-chain aminoacids in yeast: effect of carbon source on leucine biosynthetic enzymes. J. Bacteriol. 121, 959-969.

Calvo, J.M., Kalyanpur, M.G., Stevens, C.M. (1962). 2-isopropylmalate and 3-isopropylmalate as intermediates in leucine biosynthesis. Biochemistry 1, 1157-1161.

Cameron, J.R., Philippsen, P., Davis, R.W. (1977). Analysis of chromosomal integration and deletion of yeast plasmids. Nucl. Acids Res. 4, 1429-1448.

Chevallier, M.R., Aigle, M. (1979). Qualitative detection of penicillinase produced by yeast strains carrying chimeric yeast-E. coli plasmids. FEBS Letters, 180, 179-180.

Clarke, L., Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature 287, 504-509.

Clark-Walker, G.D.(1972). Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 388-392.

Clark-Walker, G.D., Miklos, G.L. (1974). Localization and quantification of circular DNA in yeast. Eur. J. Biochem. 41, 359-365.

Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969). Supercoiled DNA protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166.

Cohen, J.D., Eccleshall, T.R., Needleman, R.B., Federoff, H., Buchferer, B.A., Marmur, J. (1980). Functional expression in yeast of the Escherichia coli plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1078-1082.

Dahlems, U. (1983) Struktur des ß-Galactosidase-Gens der Hefe Kluyveromyces lactis. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.

Dobson, M.J., Futcher, A.B., Cox, B.S. (1980a). Loss of 2-µm DNA from Saccharomyces cerevisiae transformed with the chimeric plasmid pJDB219. Curr. Genet. 2, 201-206.

Dobson, M.J., Futcher, A.B., Cox, B.S. (1980b). Control of recombination within and between DNA plasmids of Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet. 2, 193-200.

Dobson, M.J., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. (1981). Sequence variation in the LEU2 region of the Saccharomyces cerevisiae genome. Gene 16, 133-139.

Faye, G., Leung, D.W., Tatchell, K., Hall, B.D., Smith, M. (1981). Deletion mapping of sequences essential for in vivo transcription of the iso-1-cytochrome c gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2258-2262.

Gerbaud, C., Fournier, P., Blanc, H., Aigle, M., Heslot, H., Guerineau, M. (1979). High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2-µm yeast plasmid. Gene 5, 233-253.

Gerbaud, C., Guerineau, M. (1980). 2-µm plasmid copy number in different yeast strains and repartition of endogenous and 2-µm chimeric plasmids in transformed strains. Curr. Genet. 1, 219-228.

Griffiths, D.E., Lancashire, W.E., Zanders, E.D. (1975). Evidence for an extra-chromosomal element involved in mitochondrial function: a mitochondrial episome? FEBS Letters 53, 126-130.

Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975). Colony hybridization. A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.

Guerineau, M., Grandchamp, C., Paoletti, C., Slonimski, P.P. (1971). Characterization of a new class of circular DNA molecules in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 550-557.

Hartley, J.L., Donelson, J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature 286, 860-865.

Hicks, J.B., Hinnen, A., Fink, G.R. (1979). Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 1305-1313.

Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933.

Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer, G., Hall, B.D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293, 717-722.

Hollenberg, C.P., Borst, P., van Bruggen, E.F.J. (1970). Mitochondrial DNA. V. A 25-µ closed circular duplex DNA molecule in wild-type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity. Biochim. Biophys. Acta 209, 1-15.

Hollenberg, C.P., Kustermann-Kuhn, B., Royer, H.D. (1976). Synthesis of high molecular weight polypeptides in Escherichia minicells directed by cloned Saccharomyces cerevisiae 2-µm DNA. Biochim. Biophys. Acta 209, 1-15.

Hollenberg, C.P. (1978). Mapping of regions on cloned Saccharomyces cerevisiae 2-µm DNA coding for polypeptides synthesized in Escherichia coli minicells. Molec. gen. Genet. 162, 23-34.

Hollenberg, C.P. (1979). The expression in Saccharomyces cerevisiae of bacterial ß-lactamase and other antibiotic resistance genes integrated in a 2-µm DNA vector. In: Extrachromosomal DNA, eds. Cummings, D.J., Borst, P., Dawid, I.B., Weissman, S.M., Fox, C.F., ICN-UCLA Symp. on Molecular and Cellular Biology 15, 325-338, Academic Press New York.

Hollenberg, C.P., Kustermann-Kuhn, B., Mackedonski, V., Erhart, E. (1981). The expression of bacterial antibiotic resistance genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In: Molecular Genetics in Yeast, eds. von Wettstein, D., Friis, J., Kielland-Brandt, M., Stenderup, A., Munksgaard, Copenhagen, Alfred Benzon Symp. 16, 109-120.

Hollenberg, C.P. (1982). Cloning with 2-µm DNA vectors and the expression of foreign genes in Saccharomyces cerevisiae. Current Topics Microbiol. Immunol. 96, 119-144.

Holm, C. (1982a). Clonal lethality caused by the yeast 2-µm DNA plasmid. Cell 29, 585-594.

Holm, C. (1982b). Sensitivity to the yeast plasmid 2µ DNA is conferred by the nuclear allele nib1. Mol. Cell. Biol. 2, 985-992.

Hsiao, C.L., Carbon, J. (1979). High frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3829-3833.

Hsiao, C.L., Carbon, J. (1981). Characterization of a yeast replication origin (ARS2) and construction of stable minichromosomes containing cloned yeast centromere DNA (CEN3). Gene 15, 157-166.

Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B. (1982). Overproduction and control of the LEU2 gene product ß-isopropylmalate dehydrogenase in transformed yeast strains. J. Biol. Chem. 257, 39-41.

Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B., Niederberger, P. (1982). Evidence that α-isopropylmalate synthase of yeast is under "general" control of amino acid biosynthesis. J. Bacteriol. 150, 969-972.

Hyman, B.C., Cramer, J.H., Rownd, R.H. (1982). Properties of a Saccharomyces cerevisiae mtDNA segment conferring high-frequency transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1578-1582.

Janowicz, Z.A., Hennig, U., Hollenberg, C.P. (1983). Synthesis of the Escherichia coli outer membrane OmpA protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Gene 20, 347-358.

Kingsman, A.J., Clarke, L., Mortimer, R.K., Carbon, J. (1979). Replication in Saccharomyces cerevisiae of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast TRP1 region. Gene 7, 141-152.

Kohlhaw, G.B., Hsu, Y.P., Lemmon, R.D., Petes, T.D. (1980). Transposed LEU2 gene of Saccharomyces cerevisiae is regulated normally. J. Bacteriol. 144, 852-855.

Kohlhaw, G.B. (1982). Regulation of leucine biosynthesis in lower eukaryotes. In: Biotechnology I, Amino Acid Biosynthesis and Genetic Regulation, eds. Herrmann, K.H., Somerville, R.S., Reading, Massachusetts: Addison Wesley, im Druck.

Livingston, D.M. (1977). Inheritance of the 2-µm DNA-plasmid from Saccharomyces. Genetics 86, 73-84.

Livingston, D.M., Kupfer, D.M. (1977). Control of Saccharomyces 2-µm DNA replication by cell division cell cycle genes that control nuclear DNA replication. J. Mol. Biol. 116, 249-260.

Livingston, D.M., Hahne, S. (1979). Isolation of a condensed, intracellular form of the 2-µm DNA plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3727-3731.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65, 500-560.

McNeil, J.B., Storms, P.K., Friesen, J.D. (1980). High frequency recombination and the expression of genes cloned on chimeric yeast plasmids. Identification of a fragment of the 2-µm circle essential for transformation. Curr. Genet. 2, 17-25.

Mercereau-Puijalon, D., Lacroute, F., Kourilsky, P. (1980). Synthesis of a chicken ovalbumin-like protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Gene 11, 163-167.

Mortimer, R.K., Schild, D. (1980). Genetic map of Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Rev. 44, 519-571.

Nelson, R.G., Fangman, W.L. (1979). Nucleosome organization of the yeast 2-µm DNA plasmid: a eukaryotic minichromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6515-6519.

Panthier, J.J., Fournier, P., Heslot, H., Rambach, A. (1980). Cloned ß-galactosidase gene of Escherichia coli is expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr. Genet. 2, 109-113.

Parsons, S.J., Burns, R.O. (1970). ß-Isopropylmalate dehydrogenase. Methods Enzymol. 17A, 793-799.

Petes, T.D., Williamson, D.H. (1975). Replicating circular DNA molecules in yeast. Cell 4, 249-253.

Ratzkin, B., Carbon, J. (1977). Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 487-491.

Reipen, G. (1982). Optimierung der Expression des bakteriellen ß-Lactamase-Gens in Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes C, Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to higher specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251.

Roggenkamp, R.O., Kustermann-Kuhn, B., Hollenberg, C.P. (1981). Expression and processing of bacterial ß-lactamase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4466-4470.

Satyanarayana, T., Umbarger, H.E., Lindegren, G. (1968). Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of leucine biosynthesis in prototrophic and leucine auxotrophic strains. J. Bacteriol. 96, 2018-2024.

Saunders, G.W., Rank, G.H., Kustermann-Kuhn, B. und Hollenberg, C.P. (1979). Inheritance of multiple drug resistance in Saccharomyces cerevisiae: linkage to leu1 and analyses of 2-µm DNA in partial revertants. Mol. gen. Genet. 175, 45-52.

Seligy, V.L., Thomas, D.Y., Miki, B.L.A. (1980). Saccharomyces cerevisiae plasmid, Scp or 2-µm: intracellular distribution, stability and nucleosomal-like packages. Nucleic Acids Res. 8, 3371-3391.

Sigurdson, D.C., Gaarder, M.E., Livingston, D.M. (1981). Characterization of the transmission during cytoductant formation of the 2µ DNA plasmid from Saccharomyces. Mol. gen. Genet. 183, 59-65.

Sinclair, J.H., Stevens, R.J., Sanghavi, P., Rabinowitz, M. (1967). Mitochondrial-satellite and circular DNA filaments in yeast. Science, 156, 1234-1237.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stinchcomb, D.T., Struhl, K., Davis, R.W. (1979). Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. Nature 282, 39-43.

Stinchcomb, D.T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E., Davis, R.W. (1980). Eukaryotic DNA segments capable for autonomous replication in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4559-4563.

Stinchcomb, D.T., Mann, C., Davis, R.W. (1982). Centromeric DNA from Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 158, 157-179.

Storms, R.K., McNeil J.B., Khandekar, P.S., An, G., Parker, J., Friesen, J.D. (1979). Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic acid sequence in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 140, 73-82.

Struhl, K. (1981). Deletion mapping of a eukaryotic promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4461-4465.

Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., Davis, R.W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039.

Szostak, J.W., Blackburn, E.H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. Cell 29, 245-255.

Tabak, H.F. (1977). Absence of 2-µm DNA sequences in Saccharomyces cerevisiae Y 379-5D. FEBS Letters 84, 67-70.

Thomas, D.Y., James, A.P. (1980). Transformation of Saccharomyces cerevisiae with plasmids containing fragments of yeast 2µ DNA and a suppressor tRNA gene. Curr. Genet. 2, 9-16.

Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., Borst, P. (1975). A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Anal. Bioch. 66, 213-220.

Toh-E, A., Guerry-Kopecko, P., Wickner, R.B. (1980). A stable plasmid carrying the yeast leu2 gene and containing only yeast DNA. J. Bacteriol. 141, 413-416.

Toh-E, A., Wickner, R.B. (1981). Curing of the 2µ DNA plasmid from Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 145, 1421-1424.

Tschumper, G., Carbon, J. (1980). Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. Gene 10, 157-166.

Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature 289, 751-758.

Zakian, V.A., Brewer, B.J., Fangman, W.L. (1979). Replication of each copy of the yeast 2-µm DNA plasmid occurs during the S-phase. Cell 17, 923-934.

7. Abkürzungen

A	- Adenin (bei Angabe von Basensequenzen)
Amp, Ap	- Ampicillin
ATP	- Adenosintriphosphat
bp	- Basenpaar
C	- Cytosin (bei Angabe von Basensequenzen)
Cm	- Chloramphenicol
cpm	- counts per minute
dATP	- Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	- Desoxycytidintriphosphat
dGTP	- Desoxyguanosintriphosphat
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
DNase	- Desoxyribonuklease
DTT	- Dithiothreitol
dTTP	- Desoxythymidintriphosphat
EDTA	- Ethylendinitrilotetraacetat
G	- Guanin (bei Angabe von Basensequenzen)
x g	- Vielfaches der Erdbeschleunigung
HIS, his	- Histidin
kb	- Kilobasenpaar
LEU, leu	- Leucin
mRNA	- messenger RNA
NAD	- Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	- reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
RNA	- Ribonukleinsäure
rpm	- revolutions per minute
rRNA	- ribosomale RNA
SDS	- Natriumdodecylsulfat
T	- Thymin (bei Angabe von Basensequenzen)
Tc, Tet	- Tetrazyklin
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	- transfer RNA
TRP, trp	- Tryptophan
URA, ura	- Uracil

Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit, für zahlreiche wertvolle Anregungen und Ratschläge und die guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. H. Dickopp bin ich für die Synthese des ß-Isopropylmalates zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie, die mir durch ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, die Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg zur Verfügung gestellt wurden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Erhart, E., Hollenberg, C.P. (1981). Curing of Saccharomyces cerevisiae 2-µm DNA by transformation.
Curr. Genet. 3, 83-89

Reipen, G., Erhart, E., Breunig, K.D., Hollenberg, C.P. (1982). Non-selective transformation of Saccharomyces cerevisiae.
Curr. Genet. 6, 189-193

Lebenslauf

27. November 1952	Geboren in Hamburg als Tochter des Landwirts Heinz Graumann und seiner Ehefrau Herta geb. Reimers
Familienstand	verheiratet mit Dr. Helmut Erhart
April 1959 - März 1963	Volksschule Hamburg-Ochsenwerder
April 1963 - Dezember 1971	Gymnasium Klosterschule in Hamburg, Abschluß: Abitur
April 1972 - Dezember 1978	Studium an der Universität Hamburg, Abschluß: Diplom im Fachbereich Biologie, Hauptfach Mikrobiologie
Februar 1979 - Januar 1980	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Strahlenphysik und Strahlenbiologie an der Gesamthochschule Essen
Februar 1980	Beginn der Promotion im Institut für Mikrobiologie an der Universität Düsseldorf

HEICO DRUCK GMBH · Grindelallee 53 · 2000 Hamburg 13 · Tel. 040/44 30 36